

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

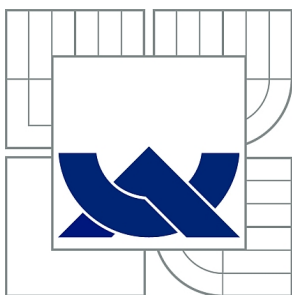
ÚČINKY ULTRAZVUKU NA BIOLOGICKÉ MATERIÁLY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

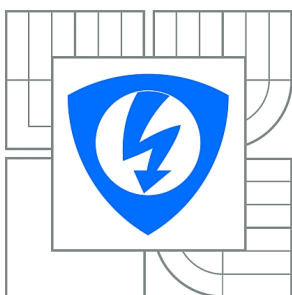
ANNA PEPRNÍČKOVÁ

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ÚČINKY ULTRAZVUKU NA BIOLOGICKÉ MATERIÁLY

EFFECTS OF ULTRASOUND ON BIOLOGICAL MATERIALS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ANNA PEPRNÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Daniel Vlk, CSc.

BRNO 2011



**VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií**

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Anna Peprníčková

ID: 115110

Ročník: 3

Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Účinky ultrazvuku na biologické materiály

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Prostudujte známé účinky ultrazvuku na biologické materiály. Zaměřte se na biomakromolekuly a bakteriální buňky. Zpracujte literární rešerši k uvedenému problému. Sledujte působení ultrazvuku (závislosti na frekvenci, době působení a intenzitě) na geneticky upravené bakteriální buňky pomocí dostupných metod (luminometr). Diskutujte získané výsledky a vhodným způsobem je prezentujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] Ultrasound interactions in biology and medicine, edited by Miller, Rosenfeld and Dober, 1983, Plenum Press, New York.
[2] GOLIÁŠOVÁ, H. Vliv ultrazvuku na fyzikální vlastnosti roztoků biomakromolekul, diplomová práce, Masarykova univerzita 2009.

Termín zadání: 7.2.2011

Termín odevzdání: 27.5.2011

Vedoucí práce: Mgr. Daniel Vlk, CSc.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

V této bakalářské práci se zabývám studiem účinků ultrazvuku na biologické materiály. V teoretické části je zpracována literární rešerše o účincích ultrazvuku na biomakromolekuly a to deoxyribonukleové kyseliny (DNA), bílkoviny (BSA) a na bakteriální buňky. Účinky ultrazvuku byly zkoumány prakticky na geneticky upravených luminiscenčních bakteriích *Escherichia coli*. Ty byly ozvučovány při různých frekvencích po stejnou dobu a poté byla měřena jejich životaschopnost pomocí luminometru. Výsledky u každé frekvence byly poté porovnávány.

Klíčová slova: ultrazvuk, DNA, BSA, bakteriální buňky, *Escherichia coli*, luminiscence

Abstract

In this bachelor thesis I deal with effects of ultrasound on biological materials. In theoretical part is write up a literature search about effects of ultrasound on biomacromolecules namely deoxyribonucleic acid (DNA), proteins (BSA) and bacterial cells. Effects of ultrasound was investigated practically on genetically modified bacterias of *Escherichia coli*. These bacterias were sounded by ultrasound by various frequencies for the same time and then their viability was measured on luminometer. The results for ever frequency were compared.

Key words: ultrasound, DNA, BSA, bacterial cells, *Escherichia coli*, luminiscence

PEPRNÍČKOVÁ, A. *Účinky ultrazvuku na biologické materiály*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011. 55 s. Vedoucí bakalářské práce
Mgr. Daniel Vlk, CSc..

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Účinky ultrazvuku na biologické materiály jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil(a) autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl(a) nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....
podpis autora (autorky)

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Mgr. Danielu Vlkovi, CSc. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Zároveň chci poděkovat RNDr. Pavlu Hyršlovi Ph.D. za pomoc a poskytnutí testovaného materiálu a přístroje a RNDr. Jiřímu Jarkovskému Ph.D. za rady při zpracování výsledků.

V Brně dne

.....
podpis autora (autorky)

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Teoretická část.....	4
2.1 Ultrazvuk.....	4
2.2 Fyzikální vlastnosti ultrazvuku.....	5
2.2.1 Typy zobrazení.....	5
2.2.2 Vyzařovací diagram sondy.....	7
2.2.3 Rychlost šíření ultrazvuku.....	7
2.2.4 Útlum ultrazvukové energie.....	8
2.2.4 Odraz a lom ultrazvukových vln.....	10
2.2.5 Rozptyl ultrazvukových vln.....	14
2.3 Mechanismy biologického působení ultrazvuku.....	15
2.4 Vliv ultrazvuku na makromolekuly.....	17
2.5 Vliv ultrazvuku na DNA.....	20
2.6 Vliv ultrazvuku na BSA.....	22
2.7 Vliv ultrazvuku na bakterie.....	24
2.7.1 Výzkum in vitro s použitím antibiotik.....	24
2.7.2 Výzkum in vitro bez použití antibiotik.....	26
2.7.3 Výzkum in vivo.....	26
3. Praktická část.....	29
3.1 Použité přístroje a pomůcky.....	29
3.2 Postup měření a popis metod.....	29
3.2.1 Roztok bakterií.....	29
3.2.2 Ozvučení.....	30
3.2.3 Luminometr.....	31
3.3 Naměřené výsledky.....	32
4.4 Diskuze.....	45
4. Závěr.....	48
5. Seznam použité literatury.....	50
7. Seznamy použitých symbolů a zkratek.....	55

Seznam obrázků

2.1	Schematické znázornění uzv zobrazení v modu A a B [4].....	8
2.2	Odraz a lom uzv vlnění [4].....	13
2.3	Schematická ilustrace rozptylu uzv vln [4].....	14

1. Úvod

Tématem tohoto semestrálního projektu je studium účinků ultrazvuku na biologické materiály.

Ultrazvuk je akustické vlnění, jehož frekvence leží nad hranicí slyšitelnosti lidského ucha, tedy nad hranicí zvuku = cca 20 kHz. Má stejnou fyzikální podstatu jako zvuk.

Byl objeven na přelomu 19. a 20. století a nyní je běžně používán v různých odvětvích např.: strojírenských, přírodovědných, lékařských atd. V lékařství se ultrazvuk hojně používá ať už pro diagnostiku, terapii nebo kosmetické aplikace. Nejčastěji se však používá při diagnostice a to zejména dynamické zobrazení B, pomocí kterého lze identifikovat cystická i solidní ložiska v měkkých tkáních. Vysoké přesnosti dosáhlo ultrazvukové vyšetření v kardiologii (echokardiografie) a v porodnictví a gynekologii. Rovněž abdominální ultrasonografie a ultrasonografie povrchových orgánů se stala součástí standardních vyšetřovacích postupů. Dále se její použití rozvíjí v ortopedii a traumatologii. [1] Při nižších intenzitách, které se v lékařství používají, nejsou výrazné negativní biologické účinky přítomny. Ty se mohou projevit až při vyšších intenzitách. Biologické účinky jsou závislé na intenzitě, frekvenci a době expozice. Proto je nutné tuto problematiku dále studovat.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjistit a zpracovat již známé informace o účincích ultrazvuku na biologické materiály zejména se zaměřením na bakteriální buňky a makromolekuly (DNA a bílkoviny). Další část byla studovat tyto účinky prakticky na roztoku geneticky upravených luminiskujících bakterií. Bakterie byly ozvučeny ultrazvukem o intenzitě 2 W/cm^2 a frekvencích 1 a 3 MHz po dobu 10 minut. Poté byla měřena jejich životaschopnost pomocí luminometru. Následně byl porovnáván rozdíl vlivu ultrazvuku o 1 a 3 MHz.

Měření byla prováděna na biofyzikálním ústavu LF MU.

2. Teoretická část

2.1 Ultrazvuk

Ultrazvuk je mechanické vlnění o frekvenci lidskému uchu neslyšitelné. V přírodě jsou ultrazvukové vlny o nízké frekvenci vyzařovány a vnímány mnoha druhy zvířat. Ultrazvuk je využíván v širokém spektru průmyslových technologií a to může znamenat zdravotní riziko, protože ve vysokých dávkách může být škodlivý. [1] Lidé mohou být vystaveni působení ultrazvuku také během léčby, hlavně při ultrazvukové diagnostice případně léčbě, stejně tak jako v chirurgii. Možné zdravotní riziko vytváří potřebu výzkumu účinků a mechanismů jeho biologické aktivity. Mechanismy účinků na biologické materiály můžeme rozdělit na tepelné a netepelné. Tepelné účinky se projevují, když je akustická energie absorbována a přeměněna na teplo, což závisí na absorpci a rozptýlení ultrazvukové energie v konkrétním (biologickém) materiálu. Netepelné účinky mohou být klasifikovány jako kavitační a napět'ový tlak. Napět'ový tlak zahrnuje účinek zářivého tlaku, síly záření a akustického proudění. Kavitate může vést k tvorbě reaktivních druhů kyslíku. [2]

Chemické účinky ultrazvuku ve vodných roztocích probíhají pomocí akustické kavitace, která způsobuje tvorbu, růst a kolaps malých plynových bublin v kapalině. Velmi vysoká teplota (řádově stovky až tisíce °C) a tlak (řádově stovky atmosfér) nebo kolaps plynových bublin vede k tepelné disociaci vodní páry na OH radikály a H atomy. Jejich tvorba byla potvrzena elektronovou spinovou resonancí. [3] O zvláštních vlastnostech ozvučovaných vodných roztoků pojednává sonochemie, jejíž kompletní popis překračuje rámec předkládané práce.

Ultrazvukové diagnostické zobrazovací metody se začaly vyvíjet na počátku 50. let. Jejich základem byla ultrazvuková průmyslová defektoskopie, což je metoda nedestruktivního průkazu vad materiálu. Tato metoda byla založena na detekci akustických rozhraní dvou prostředí na různých akustických impedancích a k detekci těchto rozhraní se nejčastěji používalo impulzní zobrazovací metody. Při této metodě byly do zkoumaného prostředí vysílány elektroakustickým měničem velmi krátké ultrazvukové impulzy a jejich odrazy na akustických rozhraních (echa) byly tímtež měničem zachyceny a po zpracování zobrazeny jako výchylky časové základny na obrazovce přístroje. Amplituda výchylky odpovídala velikosti odrazu a její poloha místu akustického rozhraní. [1]

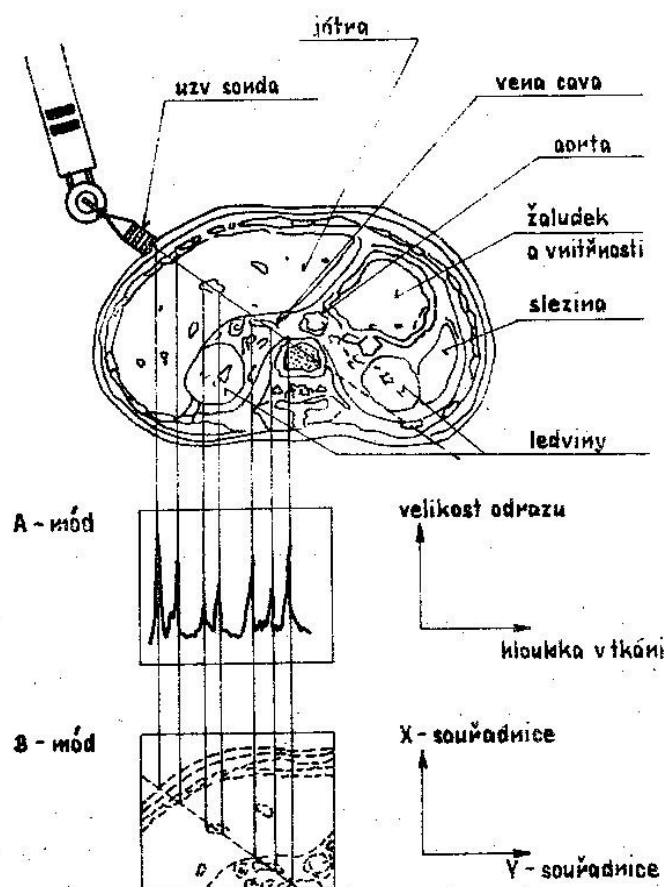
2.2 Fyzikální vlastnosti ultrazvuku

2.2.1 Typy zobrazení

Zde je popsán mechanismus ultrazvukového zobrazení. Základem ultrazvukové diagnostiky je zpracování a zobrazení ultrazvukových signálů, odražených od tkáňových rozhraní. Prvním a nejjednodušším typem ultrazvukového obrazu je zobrazení A. [1] Vysílač ultrazvukového signálu generuje impuls energie, která se šíří prostředím – tkání. Na nehomogenitách tkáně se část energie odráží a vrací se zpět k sondě, která mezi generovanými impulzy slouží jako ultrazvukový detektor. Odražené signály vytváří akustická echa, která svým časovým sledem odpovídají prostorovému šíření ultrazvukového impulsu, tedy i odrazům ultrazvukové energie. Zobrazením ech, převedených ultrazvukovým přijímačem na elektrické impulsy, na obrazovce osciloskopu získáváme informaci o distribuci tkáňových rozhraní, které protne hlavní paprsek vyzařovaného ultrazvukového svazku [4]. To je charakterizované sledem výchylek časové základny osciloskopu. Poloha výchylky odpovídá místu odrazu, její amplituda množství odražené energie. Tento typ zobrazení je stále používám v oftalmologii. [1]

Novější a nyní nejčastěji používané je dvojrozměrné zobrazení označované jako zobrazení B. [1] V zobrazení A se informace o primárním parametrickém poli prezentuje výchylkovou modulací světelné stopy časové základny osciloskopu. Zobrazení B místo výchylkové modulace využívá modulaci jasovou. [4] Původní systémy zobrazení B byly statické (snímání obrazu se dělo podle geometrického tvaru vytvořeného pomalým pohybem a nakloněním sondy na povrchu těla). Dával pouze bistabilní obrazy, na nichž kontury

vyšetřovaných orgánů byly jasně bílé na černém pozadí obrazovky. Později bylo zavedeno zobrazení pomocí odstupňované šedi, čímž je možno diferencovat mezi různě intenzivními odrazy. V současné době se používá zobrazení B dynamického typu s rychlým způsobem snímání a širokou stupnicí šedi (128 – 256 stupňů šedi). Jeho podstatou je vytvoření postupné série obrazů vyšetřované oblasti, umožňující její souvislé přehlédnutí včetně možnosti sledování pohybu. Někdy se dynamické systémy označují jako systémy pracující v reálném čase. [1]



Obr. 2.1: Schematické znázornění uzv zobrazení v modu A a B

V režimu vysílání je generován uzv impuls, který se šíří ve směru vyzařování tkání. Na rozhraních tkáňových struktur se část energie odráží a je v režimu příjmu zobrazena výchylkovou modulací – A mód. Měníme-li postupně směr vysílání uzv svazku a zajistíme-li odpovídající trajektorii rozkladu obrazu, při využití jasové modulace obdržíme B mód zobrazení. [4]

2.2.2 Vyzařovací diagram sondy

Jedním z nejdůležitějších parametrů ultrazvukové sondy, kterým se sonda podílí na dosažení prostorové rozlišovací schopnosti ultrazvukového zobrazovacího systému je tvar vyzařovacího diagramu.

Ultrazvukové pole, které je generováno měničem je možno z obecného ohledu rozdělit na dvě základní oblasti: tzv. blízké a vzdálené pole. Rozdělení pole na blízkou (Fresnelovu) a vzdálenou (Franhoferovu) oblast je dáno průběhem akustického tlaku v ose měniče. V blízkém poli vykazuje hladina intenzity celou řadu nehomogenit, rychlost částic sleduje akustický tlak s fázovým zpožděním o 90°. Ve vzdáleném poli je rychlost částic ve fázi s akustickým tlakem, hladina intenzity rovnoměrně klesá. [4]

2.2.3 Rychlost šíření ultrazvuku

Ultrazvuk se od zdroje šíří prostředím v podobě vlnění, které podle směru kmitání částic prostředí rozdělujeme na podélné – longitudiální (pohyb částic se děje ve směru šíření vlnění) a příčné – transversální (částice kmitají kolmo na směr šíření vlnění). K přenosu kmitavého pohybu z jedné částice na druhou je potřeba určitého času, který je charakteristický pro každé pružné prostředí a udává rychlost šíření (fázovou rychlost) ultrazvuku v tomto prostředí. Pro tekuté prostředí, jemuž jsou do určité míry analogické měkké tkáně těla (parenchymatosní orgány, svaly, mozek), závisí rychlost šíření ultrazvuku c na modulu objemové pružnosti K a hustotě prostředí ρ vztahem:

$$c = \frac{K}{\rho} \quad [\text{m.s}^{-1}] \quad (2.1)$$

V tekutinách a tedy i v měkkých tkáních se ultrazvuk šíří jen formou podélných vln. V pevných látkách je způsob šíření ultrazvuku složitější. Šíří se zde totiž jak vlnami příčnými tak i povrchovými. [5]

Médium	Rychlost [m.s ⁻¹]
vzduch	331
destilovaná voda	1,53.10 ³
krev	1,57.10 ³
kosti	2,5 - 4,7.10 ³
tuk	1,45.10 ³
ledviny	1,56.10 ³
svalovina	1,59.10 ³

Tabulka 2.1: Rychlost šíření uzv vlnění v některých tkáních lidského těla

Rychlost šíření ultrazvuku v různých tkáních je v širokém rozsahu nezávislá na frekvenci f ultrazvukového vlnění (jestliže můžeme zanedbat disperzi – rozptyl). Lze tedy využít jednoduchý vztah mezi vlnovou délkou λ a frekvencí. [4]

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (2.2)$$

2.2.4 Útlum ultrazvukové energie

V mechanismu útlumu se uplatňují dvě hlavní složky: absorpce a rozptyl. Při absorpci dochází ke snižování intenzity přeměnou akustické energie ultrazvukové vlny v teplo. Při rozptylu se intenzita ultrazvukové vlny snižuje odrazem, ohybem a lomem vlnění na nehomogenitách prostředí. V homogenním prostředí je útlum způsoben převážně absorpcí. V nehomogenním prostředí se uplatňují oba mechanismy, přičemž útlum rozptylem může převládnout. Protože tkáně vykazují vždy určitý stupeň nehomogenosti, je nutno u nich počítat s rozptylem jako s významnou složkou útlumu. Zatímco rychlost šíření je nezávislá na použité ultrazvukové frekvenci, je útlum na frekvenci závislý a to tak, že se vzrůstající

frekvencí se útlum zvyšuje. Tato skutečnost ovlivňuje volbu ultrazvukové frekvence pro požadovanou hloubku vyšetření.

Při průchodu ultrazvukového vlnění pružným prostředím se jeho intenzita snižuje – dochází k útlumu. Je-li tloušťka útlumové vrstvy x pak intenzita I_x v tomto místě je oproti intenzitě I_0 dána vztahem:

$$I_x = I_0 e^{-2\alpha x} \quad (2.3)$$

kde symbol α představuje tzv. lineární koeficient útlumu, který se vyjadřuje nejčastěji v dB.

Třetí základní veličinou, která charakterizuje akustické vlastnosti prostředí je ultrazvukový vlnový odpor neboli akustická impedance z . Pro rovinnou ultrazvukovou vlnu je dána součinem hustoty prostředí ρ a rychlosti šíření c : [5]

$$z = \rho * c \quad [\text{Pa.s}^{-1}] \quad (2.4)$$

Tkáně	α [dB.cm ⁻¹]
lebeční kost	13 - 14
holení kost	8
kůže	3,4
srdeční sval	2 – 2,5
sval	1,1 – 1,3
mozek	0,9
tuk	0,5 - 0,6
krev	0,17

Tabulka 2.2: Koeficient celkového útlumu pro některé lidské tkáně [4]

2.2.4 Odraz a lom ultrazvukových vln

V homogenním prostředí se ultrazvukové vlnění šíří přímočaře. Dopadne-li ultrazvukový svazek na rozhraní dvou prostředí o rozdílných akustických impedancích projde zčásti do druhého prostředí a zčásti se odrazí zpět. Při přechodu z jednoho prostředí do druhého mění vlnění svůj směr šíření (pokud nejde o kolmý dopad) – vlnění se láme. K odrazu a lomu dojde však jen tehdy, pokud jsou rozměry rozhraní (překážky) větší než je vlnová délka ultrazvukového vlnění. Při řádově stejných rozměrech překážky a vlnové délky je lom provázen ohybem (difrakcí) vlnění.

Poměr amplitudy odraženého echa k amplitudě echa před dopadem na rozhraní, od kterého se ultrazvuková vlna odráží, je označován jako amplitudový reflexní koeficient r_a .

Při dopadu ve směru normály k rovině akustického rozhraní může být amplitudový reflexní koeficient stanoven ze vztahu:

$$r_a = \frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2} \quad (2.5)$$

kde: Z_1 je akustická impedance prostředí 1

Z_2 je akustická impedance pro prostředí 2

Kromě amplitudového reflexního koeficientu r_a se často používá tzv. intenzitní reflexní koeficient r_i definovaný poměrem reflektované intenzity akustické vlny k její intenzitě před dopadem na akustické rozhraní. Vzájemný vztah obou veličin je:

$$r_i = r_a^2 \quad (2.6)$$

Část ultrazvukové vlny, které není na akustickém rozhraní odražena se láme a pokračuje v šíření do druhého prostředí v odlišném směru. Poměrná velikost intenzity ultrazvukové vlny, která pokračuje v šíření po lomu I_t vzhledem k vstupní intenzitě I_i je dána:

$$G = \frac{I_t}{I_i} = 1 - r_a^2 \quad (2.7)$$

resp. s použitím rovnice

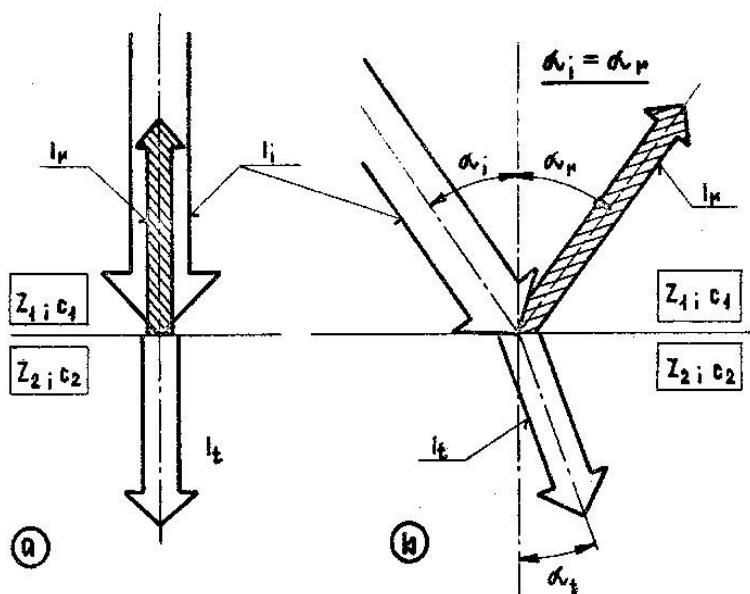
$$G = 1 - r_i \quad (2.8)$$

Její hodnota G definuje tzv. koeficient přenosu ultrazvukové energie.

Úhel lomu α_t je závislý na rychlosti šíření ultrazvukové vlny v obou prostředích. Poměr sinu úhlu dopadu a lomu je dán Snellovým zákonem:

$$\frac{\sin \alpha_i}{\sin \alpha_t} = \frac{c_1}{c_2} = n_{1,2} \quad (2.9)$$

který definuje index lomu ultrazvukové vlny. [4]



Obr 2.2: Odraz a lom uzv vlnění

Úhel odrazu α_r je nezávislý na velikosti akustické impedance a je totožný s úhlem dopadu α_i .

kde: Z_1 - akustická impedance prostředí 1

Z_2 - akustická impedance prostředí 2

C_1 - rychlost šíření uzv vln v prostředí 1

C_2 - rychlost šíření uzv vln v prostředí 2

α_i - úhel dopadu

α_r - úhel odrazu

α_t - úhel lomu

I_i - vstupní intenzita

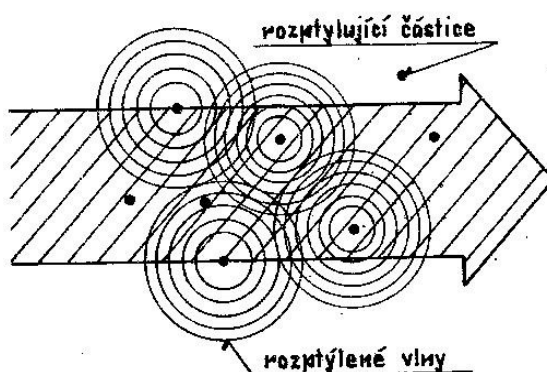
I_r - intenzita odrazu

I_t - intenzita po lomu

2.2.5 Rozptyl ultrazvukových vln

Rozptyl (disperze) ultrazvukových vln nastává zejména v prostředí, ve kterém jsou rozptýleny částice, jejichž geometrické rozměry jsou srovnatelné s vlnovou délkou ultrazvukové vlny (např. krev, která obsahuje erytrocyty). Malé částice absorbují část ultrazvukové energie a opět ji generují do všech směrů jako sférické pole.

Mechanismus rozptylu je označován jako Rayleighův rozptyl. Experimentálně bylo ověřeno, že tento rozptyl závisí na změnách akustické impedance rozptylujících částic, jejich velikosti a frekvenci ultrazvukového vlnění. Velikost rozptylu se prudce zvyšuje se vzrůstem frekvence. K rozptylu ultrazvukové vlny může docházet také na nepravidelné struktuře povrchu některých orgánů. V důsledku toho mohou být zobrazeny i některé části orgánů, na které nedopadá ultrazvuková vlna v kolmém směru. [4]



Obr. 2.3: Schematická ilustrace rozptylu uzv vln

2.3 Mechanismy biologického působení ultrazvuku

Jestliže se odvážíme konstatovat, že jakákoliv aktivní diagnostická metoda je neinvazivní, musí být jednoznačně prokázáno, že energie, která je absorbována tkání nezpůsobí nevratné změny tkáně, které by ohrožovali existenci jednak samotného organismu a jednak také jeho dalších generací. Tzn., že absorbovaná dávka energie musí být menší než prahová. Experimenty na zvířatech neprokázaly žádné škodlivé účinky ani po dlouhodobé expozici v průběhu gravidity.

Světová zdravotnická organizace v roce 1976 vypracovala doporučení na základě posouzení aplikace ultrazvuku v lékařství, ze kterého vyplývá, že ve frekvenčním rozsahu 1 - 20 MHz nebyly pozorovány žádné biologické účinky při intenzitách menších než 100 mW/cm^2 a expozičních časech do 500 s. [4]

Biologický účinek ultrazvuku je vždy komplexního charakteru a je výsledkem multifaktoriálního působení primárních i sekundárních účinných složek ultrazvukového pole. Při podrobné analýze je však možné v mechanismu diferencovat 3 skupiny jevů:

Tepelné jevy – vznik tepla v ultrazvukovém poli je bezprahový jev a dochází k němu v důsledku transformace akustické energie v průběhu absorpce. Zvýšení teploty se tak stává konstantním a významným faktorem biologického působení ultrazvuku. Teplo v biologickém prostředí vzniká dvěma způsoby: vnitřním třením a relaxačními procesy. V homogenním prostředí převládá vnitřní tření a v nehomogenním relaxační děje.

Kavitační jevy – ultrazvukovou kavitací rozumíme porušení kontinuity tekutého prostředí v podtlakové fázi ultrazvukové vlny spojené s vytvořením bubliny různého poloměru. Ke vzniku bubliny je třeba určitého podtlaku, kavitace je tedy prahovým jevem. Bublina se může chovat dvojím způsobem. Jeden způsob je, že se bublina dostane do rázových pulsací v rezonanci s tlakovými oscilacemi ultrazvukové vlny – tento druh kavitace se nazývá stálý nebo rezonanční. Bublina snižuje energii ultrazvukové vlny přeměnou v teplo a rozptylem. Další způsob je zvětšení poloměru několika oscilacemi a její prudký kolaps – přechodná kolapsová kavitace. Kolaps je spojen s prudkým vzrůstem teploty (až 10^3 K) a silným tlakovým rázem (až 10^6 Pa). Bublina se rozpadne na větší počet malých bublin. Ty se mohou stát novými kavitačními jádry.

Netepelné a nekavitační jevy – jevy vázané na střídavý charakter ultrazvukového pole při intenzitách pod kavitačním prahem. Někdy se tyto jevy řadí pod společný název akustický stres. Hlavními představiteli jsou viskózní tlak a radiační síla. V jejich důsledku vzniká mikroproudění v blízkosti akustických rozhraní. To může vně i uvnitř buňky ovlivňovat některé základní biologické pochody. Záleží na elasticitě struktur. U tkání se proto poškození ultrazvukem projeví nejdříve funkčními změnami (reverzibilní fáze) a následně morfologickými lézemi (ireverzibilní fáze). [5]

Problematika kavitace a její hranice v biologických tkáních je jeden z hlavních bodů ve výzkumu mechanismu biologických účinků ultrazvuku. Curtis při zkoumání na tenkých řezech jater a jiných tkáních objevil tzv. „díry“. Ty mohou být stejně jako slabý šum při nižších frekvencích, který byl poprvé zaznamenán Hillem při frekvenci okolo 1 W/cm², způsobeny právě kavitací. Na rozdíl od toho Gavrilov prokázal, že kavitační hranice pro přímý ultrazvuk nebyla více než dvakrát větší než kavitace ve vodovodní vodě. Pokud je tento vztah platný pro rovinné vlny, potom můžeme očekávat kavitaci ve tkáních při intenzitě 0,6 W/cm². Při této intenzitě akustický tlak dosahuje hodnoty 1 atmosféry. Hranice měřena experimentálně ve vodě při 1 MHz souhlasí s teoretickými hodnotami.

Kromě charakteristického šumu, sonoluminiscence a tvorby peroxidu vodíků, dusičnanů a kyseliny dusité, OH-radikálů a jiných látek může být považován za hlavní znak akustické kavitace ve vodním médiu nasycení vzduchem. [6]

Hodnoty rychlosti ultrazvuku a absorpčního koeficientu v roztocích jsou definovány různými molekulárními interakcemi. Hodnota absorpce v kapalinách klesá s vlnovou energií kvůli stříhu a viskozitě, termoreduktivitě a odlišných relaxačních procesech vyskytujících se během kompresních a dekompresních cyklů v ultrazvukovém poli.

Hlavní relaxační procesy, které mohou nastat v biologických roztocích je porucha přenosu protonů a porucha iontových vazeb, hydratace a rovnováha vodíkových vazeb. Relaxační procesy mohou být prokázány pomocí měření závislosti frekvence buďto na rychlosti nebo na absorpci ultrazvukových vln. U vodných roztoků biopolymerů, hlavně bílkovin a nukleových kyselin při neutrálním pH, bylo prokázáno široké spektrum relaxačních procesů, které jsou připisovány hlavně pohybu segmentů hlavních a okrajových skupin molekul polymerů. Toto spektrum je velmi podobné pro všechny biopolymery a dokonce i pro mnoho syntetických polymerů.

Ultrazvuková absorpce v roztocích proteinů má maximum v zásadité i kyselé oblasti kvůli procesům přesunu protonů, které zahrnují disociaci a ionizovatelné aminokyselinové zbytky. Tento průběh v bílkovinách a aminokyselinách je nejčastěji zkoumaný relaxační fenomén v roztocích biologických látek. [7]

2.4 Vliv ultrazvuku na makromolekuly

Ultrazvuk může poškozovat makromolekuly ultrasonickou kavitací a to buď mechanicky (stříhem) a/nebo sonochemicky (tvorbou volných radikálů). Stále není uspokojivě vyřešeno a je náročný problém zjistit, jestli poškození makromolekul způsobuje přímý mechanický tlak (napětí) nebo nepřímý mechanismus, který zahrnuje volné radikály nebo jiné toxické látky vzniklé při ozvučení. [8]

Synergické vlivy ultrazvuku a chemických látek na buňky jsou známy jako sonodynamická terapie, jež je v posledních letech podrobně zkoumána, vzhledem ke stále většímu výskytu rakoviny a snahy o její léčbu. Na toto téma již bylo a stále je prováděno množství studií.

Jeden z výzkumů byl prováděn za pomoci dvou ftalokyaninů (Zn a AlCl), které byly testovány jako potenciální sonosenzitizéry pro sonodynamickou terapii. Byly studovány

účinky ultrazvuku a ftalokyaninů na erytrocyty kapra jako jaderný model buňky. Byly sledovány tyto parametry: stupeň hemolýzy, osmotická křehkost, peroxidace lipidů a oxidace hemoglobinu. Červené krevní buňky byly preinkubované s ftalokyanin a vystaveny nepřetržitému ultrazvuku o frekvenci 1 MHz po dobu 5 min. Bylo zjištěno, že vystavení ultrazvuku a ftalokyaninu vedlo ke zvýšenému stupni hemolýzy, produktů peroxidace lipidů a osmotické křehkosti ve srovnání se samotným ultrazvukem nebo samotným ftalokyaninem. Nicméně tyto faktory nezpůsobily změny stupně oxidace hemoglobinu. Výsledky vedou k závěru, že ftalokyanin způsobuje s ultrazvukem synergický efekt, ale mechanismy této akce jsou stále nejasné. [9]

Další výzkumy vlivu ultrazvuku na biologické materiály byly prováděny také na zředěné suspenzi lidských erytrocytů. Tato suspenze byla vystavena ultrazvuku in vitro o frekvenci 1 MHz. Stupeň lýzy buněk stoupal se zvyšujícím se časem expozice. Po přidání malého množství plazmy do suspenze se stupeň lýzy ustálil a dále nezvyšoval. Gelová elektroforéza membránových proteinů extrahovaných ze vzorků membrán po lýze ukázala, že expozice ultrazvuku způsobila molekulární poškození membránových proteinů bez přítomnosti plazmy. Naopak při přidání malého množství plazmy chránila proteiny před molekulárním poškozením. [10]

Dále bylo zjištěno, že ultrazvuk umí reverzibilně i ireverzibilně narušit membrány životaschopných buněk mechanismem, který zahrnuje kavitaci. [11]

Tohoto mechanismu, čili kavitace se dá využít jako možné mechanické metody pro vpravení malých molekul do cílových buněk. Tento pokus byl prováděn při léčbě podkožního nádoru myšího lymfomu. Na ten byl aplikován ultrazvuk o frekvenci 1 MHz a době ozvučení 5 min. Dále byla aplikována intratumorální injekce plasmidové DNA obsahující luciferázu reportující geny. Ultrazvuková léčba ozářením potlačila růst nádoru. Aktivita aplikované luciferázy v DNA ukázala, že ultrazvukovým ozářením bylo dosaženo lepší účinnosti transfekce než když byla plasmidová DNA aplikována samostatně. Tím bylo zjištěno, že nízká úroveň energie ultrazvuku, která je v současnosti užívána pro diagnostické účely a fyzickou terapii v klinických oborech může zvyšovat chemosenzitivitu in vivo a pomáhat při léčbě tumorů. [12]

Tato metoda, tedy ultrazvukem zprostředkované vpravování léků je nechemická, nevirová a neinvazivní a slouží pro cílený transport léků a genů do buněk. Molekuly mohou být vpraveny do buňky když ultrazvuk naruší buněčnou membránu kavitací. [13]

Další studie zkoumá molekulární vychytávání a životaschopnost buňky v suspenzi buněk (DU 145 rakoviny prostaty a hladké svaloviny tepen), které byly vystaveny různým hodnotám akustického tlaku, času expozice a pulzní délce v přítomnosti kontrastní látky Optison. Se vzrůstajícím tlakem a časem expozice molekulární vychytávání sloučenin a kalceinu stoupalo a blížilo se rovnováze s extracelulární suspenzí, zatímco životaschopnost klesala. Různé pulzní délky neprokazovaly výrazný vliv. Výsledné hodnoty životaschopnosti a molekulárního vychytávání získaných během měření široké škály ultrazvukových podmínek studie měly souvislost s vystavením akustické energii. Vystavení akustické energii může být prediktivní pro ultrazvukové nontermální biologické účinky. [13]

Akustická kavitace může také naopak působit jako zatěžující parametr pro léky, bílkoviny a DNA v životaschopných buňkách a to jako komplexní funkce akustických a neakustických parametrů. I tento výzkum Guzman a kol. byl prováděn na buňkách rakoviny prostaty DU 145 a to na suspenzích těchto buněk o různých koncentracích buněk na 1 ml. Tyto suspenze byly ozvučeny ultrazvukem o frekvenci 500 kHz v různých rozsazích akustické energie, maximálního podtlaku a času expozice v přítomnosti různých počátečních koncentrací bublin s kontrastní látkou Optison. Molekulární vychytávání kalceinu a životaschopnost buněk se zvyšovala se zvyšující se hustotou buněk. Životaschopnost naopak klesala a vychytávání se nezměnilo při zvyšování počáteční koncentrace kontrastní látky. Biologické účinky stoupaly se zvyšující se denzitou buněk a klesaly se zvyšující se koncentrací bublin. Další analýza vedla k odhadu velikosti „poloměru výbuchu“ kolem kterého bubliny zabily nebo permeabilizovaly buňky. Tyto poloměry byly 3 – 90 krát velikost poloměru bubliny. K rozsáhlému molekulárnímu vychytávání buňkami při vysoké životaschopnosti dochází při expozici ultrazvuku o nízké energii a vysokém poměru buňka – bublina. [14]

Na molekulární vychytávání a životaschopnost buněk má vliv také velikost molekul. Molekulární vychytávání v životaschopných buňkách mělo závislost na vystavení akustické energii. Molekulární vychytávání se ukázalo být heterogenní mezi životaschopnými buňkami

vystavenými stejným ultrazvukovým podmínkám Tato heterogenita má také vztah s vystavením akustické energii. Výsledek ukázal, že ultrazvuk znamená zatížení životaschopnosti buněk s velkým počtem makromolekul. [15]

2.5 Vliv ultrazvuku na DNA

Molekuly DNA jsou nositelem genetické informace – obsahují informace i syntéze všech proteinů organismu. Úseky DNA nesoucí informaci o syntéze bílkovin se označují jako strukturní geny. DNA jsou extrémně dlouhé polynukleotidy, které obsahují vedle deoxyribosy purinové báze adenin a guanin a pyrimidinové báze cytosin a thymin. Molekuly DNA jsou dvouvláknové. Představují svazek dvou vláken, přičemž obě vlákna mají opačnou polaritu. V jednom řetězci je směr 5' → 3' a ve druhém 3' → 5'. Oba řetězce jsou navzájem komplementární tj. proti sobě umístěné nukleotidy jsou poutány vodíkovými vazbami. Vodíkové vazby vznikají mezi adeninem a thyminem a dále mezi cytosinem a guaninem. Párování bází je dáno tak, že jeden řetězec určuje sekvenci bází v druhém.

DNA se nejčastěji nachází ve formě pravotočivé šroubovice (model podle Watson – Cricka). Dva polynukleotidové řetězce se stáčí podél podélné osy. Kostru molekuly tvoří diesterově vázané molekuly deoxyribosy a fosfátu. Do nitra dvojšroubovice jsou orientovány purinové a pyrimidinové báze. Páry bází leží vodorovně nad sebou (kolmo k podélné ose šroubovice), což přispívá ke stabilitě šroubovice. [16]

Zde jsou studie k tématu vlivu ultrazvuku na DNA.

Např. výzkum Milowské a Gabrielak. Po ozvučení nepřetržitým ultrazvukem o frekvenci 1 MHz a o intenzitách 0,61 – 2,44 W/cm² byla v inkubačním mediu sledována tvorba reaktivních druhů kyslíku. Volné radikály a peroxid vodíků vzniklý ultrazvukovou expozicí mohou vézt k poškození DNA. Jaderné krvinky ryby byly vystaveny ultrazvuku in vitro o stejné intenzitě a frekvenci. Bylo zaznamenáno, že ultrazvuk ve všech užitých intenzitách vyvolal rozpad DNA. Tento účinek nebyl eliminován přidáním katalázy, která ukazuje, že rozpad DNA nebyl způsoben pouze peroxidem vodíků. Výsledky ukazují, že rozpad DNA může být opraven. Tyto mechanismy jsou nejefektivnější po 30 a 60 min po

ozvučení. Navíc byl zkoumán ultrazvuk vyvolávající rozpad DNA v blízkosti sonosenzitizéru (Zn a AlCl₃-ftalokyanin). Bylo zaznamenáno, že ftalokyanin (Pcs) sám nebo s ultrazvukem nevyvolává významné změny ve stupni poškození DNA. [17]

Další studie [18] srovnává výsledky vystavení DNA ve vodném roztoku a DNA biologické tkáni ultrazvuku. Ty se od sebe liší. V intenzitách ultrazvuku srovnatelných s těmi používanými klinicky, je možné poškodit ultrazvukem čištěné DNA ve vodném roztoku. Ultrazvuk lze využít jako užitečný nástroj pro přípravu DNA fragmentů in vitro. K ultrazvukovému poškození DNA v roztoku dochází rozbitím vodíkových vazeb a zlomům v jednořetězcové a dvouřetězcové šroubovici DNA. Za to jsou odpovědné hlavně 2 mechanismy: kavitace a tepelný a mechanický efekt. Stabilní kavitace je pozorována při nízkých intenzitách ultrazvuku. Vzrůstající intenzita ultrazvuku okolo 2 W/cm² je následována vzrůstem zlomů v jednořetězcové DNA díky tvorbě volných radikálů v důsledku přechodné kavitace. Následující ozvučení - rozdělení výsledných fragmentů DNA, se blíží k nižšímu velikostnímu limitu 100 - 500 bp. Vznikají DNA fragmenty s fosforylovaným 5' koncem a volným alkoholem na 3' konci. Štěpení šroubovice DNA zatím neprokázalo další specifitu, proto řadí ultrazvuk jako doplňkově alternativní k vysoce specifické fragmentaci získané restrikcí endonukleázy.

Tato studie ukazuje, že přímé vystavení buněk silné ultrazvukové kavitaci způsobuje převážně mechanickou lýzu buněk, ale může být přítomen také skrytý vliv díky produkci toxických látek, které vznikají, pokud dochází ke kavitaci. Výzkum byl prováděn na stabilizačním roztoku fosfátového pufru (PBS), který byl vystaven ultrazvukové kavitaci o frekvenci 1,61 MHz při 20°C v rotační trubici sloužící k tvorbě toxických produktů. Léčba byla prováděna na buňkách vaječníků čínského křečka a to ve velmi nízké teplotě. Při léčbě byly vyvolány zlomy v jednořetězcové DNA. Zlomy mohou být při zahřívání opraveny. Nepřímý účinek poškození by mohl být vysvětlen kavitací generovaným peroxidem vodíků, který vznikl v PBS, dále rozpuštění plynu argonu v PBS a H₂O₂ produkci. [19]

Byly prováděny i epidemiologické studie působení ultrazvuku právě z hlediska poškození DNA. Těchto studií ale bylo provedeno málo. Jedna z nich pojednává o možnosti poškození DNA ultrazvukem nepřímo. Studie byla prováděna na lékařských pracovnících, kteří přicházejí do styku s ultrazvukem. Výsledky vyšetřování ukázaly, že při individuálním pracovním vystavení ultrazvuku může dojít ke zvýšenému genotoxickému riziku. [20].

2.6 Vliv ultrazvuku na BSA

Bílkoviny (proteiny) jsou biopolymery složené z L-aminokyselin spojených peptidovou vazbou do dlouhých polypeptidových řetězců. Proteiny obsahují přibližně od 100 až do několika tisíců aminokyselinových zbytků a mají vyšší organizovanost než peptidy. Bílkoviny mají vždy charakteristické prostorové uspořádání, které je dáno nekovalentními interakcemi mezi úseky řetězce tzv. nativní konformace bílkoviny. Bílkoviny vznikají proteosyntézou, která je řízena geneticky. Pro každou bílkovinu je dáno pořadí a počet aminokyselinových zbytků genetickým kódem. Jsou nezbytné pro základní životní procesy, mezi hlavní funkce bílkovin patří funkce strukturní - skelet buněčných i mimobuněčných struktur (membránové bílkoviny, kolagen), metabolická - enzymy (pepsin), transportní (hemoglobin), jsou též jediným zdrojem dusíku pro syntézu dalších bílkovin a funkce informační – bílkovinné protilátky (monoglobuliny, hormony). [16]

Albumin je protein tvořený v játrech. Tvoří obvykle 55-65 % všech plasmatických bílkovin. V cévním řečišti je 40 %, extravazálně (zvláště kůže) je 60 %. Na jeho koncentraci závisí koloidně osmotický tlak plasmy (onkotický tlak) – zajišťuje návrat tekutiny do kapilár na venozním konci, váže a transportuje řadu krevních složek, je zásobárnou aminokyselin pro tvorbu bílkovin a hlavním antioxidantem plasmy. Tvorba albuminu je snížena při vzestupu onkotického tlaku v extracelulární tekutině jater, při snížené dostupnosti aminokyselin.

Mezi bílkoviny na kterých bylo sledováno působení ultrazvuku, patří i BSA.

Tato studie popisuje vliv ultrazvuku o vysoké intenzitě na funkční a strukturální vlastnosti BSA ve vodném roztoku. Funkční vlastnosti BSA byly ultrazvukem pozměněny. Povrchová aktivita BSA stoupala, minimální změny byly pozorovány v celkové struktuře BSA, ale povrchový náboj stoupal zejména na základě pH hodnot (např. $\text{pH} > 9$). I když dynamické měření rozptylu světla ukázalo, že částice byly zvětšené až 3,4 krát po 90 min ozvučení, nebyl sledován žádný významný vzrůst v oligomerním stavu BSA. To bylo prováděno pomocí nativní PAGE. Část volných sulfhydrylových skupin v BSA po 90 min ozvučení pokleslo. Zvětšující se velikost částic a zmenšující se počet volných sulfhydrylových skupin mohou být způsobeny tvorbou proteinových agregátů. Povrchová hydrofobicita stoupala a byly prokázány změny v sekundární struktuře BSA. Předpokládá se,

že mechanické, tepelné a funkční účinky ultrazvuku způsobují strukturální změny v BSA které pozměňují funkční vlastnosti makromolekuly. Ty mohou být způsobeny ultrazvukem. [21]

Přidáním dalších látek jako je třeba metronidazol nebo ZnO může být podpořeno sonokatalycké poškození BSA pod ultrazvukovým ozářením. [22]

Další studie sledovala vliv ultrazvuku na povrchové napětí a taky vliv při přítomnosti iontů. V první sérii měření byla zkoumána změna roztoků BSA po ozvučení. Koncentrace roztoků BSA byla 10 a 100 $\mu\text{mol/l}$.

Přítomnost iontů v roztoku BSA vyvolala snížení povrchového napětí, aniž by byly roztoky ozvučeny. Změny v závislosti na době po ozvučení byly minimální. Ačkoliv absorpční maximum se přidavkem iontů k neozvučenému roztoku BSA nezměnilo, po ozvučení byly pozorovány mírné změny absorbance.

Výsledky ukazují, že působením ultrazvuku dochází ke změnám konformace BSA. K větším rozdílům povrchového napětí docházelo u roztoku o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Odlišné chování roztoků po ozvučení a po ohřevu naznačuje, že vliv ultrazvuku na roztoky BSA je odlišný od vlivu ohřevu. Avšak v případě měření absorpčního spektra nebyly odlišnosti patrné. Změny povrchového napětí i absorbance se lišily v závislosti na koncentraci BSA i na koncentraci iontů. Tyto rozdíly právě ukazují na možné změny konformace studované bílkoviny, případně na agregaci molekul po ozvučení. [23]

2.7 Vliv ultrazvuku na bakterie

Účinky ultrazvuku byly zkoumány na bakteriích a to zejména na biofilmech. Biofilmy jsou komplexní, diferencované a strukturované komunity bakterií. [24] Byly zkoumány jak účinky antibiotik podpořené účinkem ultrazvuku a to in vitro a in vivo, tak i účinek ultrazvuku na bakterie samotné. Níže vybrané studie prováděné in vivo byly měřeny při aplikaci biofilmů do králíků. Zde jsou studie, které popisují tuto problematiku.

2.7.1 Výzkum in vitro s použitím antibiotik

Byl zkoumán vliv ultrazvuku na transport antibiotika gentamicinu přes biofilmy s koloniemi *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Některé z těchto biofilmů byly vystaveny ultrazvuku o frekvenci 70 kHz a poté bylo spočítáno množství gentamicinu, který prošel přes biofilm. Ozvučení významně zvýšilo transport gentamicinu skrz biofilm. Ultrazvuk významně zvyšuje transport gentamicinu přes biofilmy, který je normálně blokový nebo zpomalený pokud není vystaven ultrazvuku. Tento zvýšený transport může být částečně zodpovědný za zvýšené zabíjení bakteriálního biofilmu vystaveného kombinací antibiotik a ultrazvuku. [25]

Současné studie ukázaly, že aplikace antibiotik spolu s nízkou silou ultrazvuku výrazně zvyšuje zabíjení planktonních bakterií antibiotiky. Výzkum byl prováděn na biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. Při použití ultrazvuku byly účinky gentamicinu podpořeny. Naproti tomu ultrazvuk sám o sobě neměl žádné škodlivé účinky na životaschopnost biofilmu. Pro redukci životaschopnosti biofilmu jsou více efektivnější nižší frekvence ozvučení než vyšší frekvence. [26]

Biofilmy *Pseudomonas aeruginosa* na které bylo aplikováno antibiotikum gentamicin byly vystaveny nepřetržitému ultrazvuku o frekvenci 500 kHz a výkonu 10 mW/cm². Použití ultrazvuku zvýšilo zabíjení buněk téměř o dva řády. Bylo vysledováno, že ultrazvuk o nízké intenzitě nenarušuje biofilm. [27]

Byl zkoumán vliv erytromycinu na planktonní kultury *Pseudomonas aeruginosa* s aplikací a bez aplikace ultrazvuku o frekvenci 70 kHz. Ultrazvuk v kombinaci s erytromycinem redukoval životaschopnost *P. aeruginosa* o 1 - 2 řády ve srovnání s antibiotiky samotnými, i při koncentraci pod minimální inhibiční koncentraci. Ultrazvuková indukce podporuje působení antibiotik rozrušením nebo napětím membrány. [28]

Studie efektu ultrazvuku a trvání expozice na zvýšení ultrazvukové akce gentamicinu proti biofilmu *Escherichia Coli*. Ultrazvuk byl aplikován na klinické úrovni, která nezpůsobuje poškození lidské tkáně. Studie prokázala, že nižší frekvence způsobují vyšší úroveň zabíjení. Výsledek experimentu ukazuje že kompletní sterilizace 14 hod starého biofilmu může být dosaženo po 6 hod expozice.[29]

Byl měřen účinek gentamicinu na planktonické kultury *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus* s aplikací a bez aplikace ultrazvuku o frekvenci 67 kHz. Ultrazvuk byl aplikován na úrovni, která neměla žádnou inhibiční nebo baktericidní účinky proti bakteriím. Měření bakteriální aktivity gentamicinu proti planktonním kulturám *P. Aeruginosa* a *E. coli* ukázala, že současná aplikace ultrazvuku podpořila efektivitu antibiotik. Životaschopnost bakterií byla redukována o několik řádů při kombinaci gentamicinu a ultrazvuku, které sami o sobě životaschopnost nesnižují. Jak kultury stárly, stávaly se bakterie více resistantní k účinku samotných antibiotik. Aplikace ultrazvuku zvrátila tuto rezistenci. Ultrazvuková léčba zvyšující aktivitu antibiotik byla evidentní u kultur *P. aeruginosa* a *E. coli*, ale nebyla sledována s kulturami Gram-pozitivních *S. Epidermidis* a *S. Aureus*. [30]

2.7.2 Výzkum in vitro bez použití antibiotik

Legionella pneumophila a *Acanthamoeba castellanii* byly po různé časové periody vystaveny ultrazvuku o frekvenci 36 kHz. Ultrazvuk dlouhodobě nezpůsobuje poškození životaschopnosti bakterií. [31]

Byl zkoumán vliv ultrazvuku na zvýšení tempa růstu bakterií *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Buňky rostly na polyethylenovém povrchu za přítomnosti ultrazvuku. Bylo zjištěno, že nízkofrekvenční ultrazvuk o frekvenci 70 kHz zvyšoval tempo růstu buněk ve srovnání s buňkami rostoucími bez přítomnosti ultrazvuku. Nicméně při vysoké úrovni intenzity byly buňky částečně odstraněny z povrchu. Ultrazvuk také podpořil planktonický růst *Staphylococcus Epidermidis* a dalších planktonických bakterií. Předpokládá se, že ultrazvuk zvyšuje rychlost transportu O_2 a výživných látek do buněk a zvyšuje rychlost transportu odpadních produktů pryč z buňky a tak urychluje jejich růst. [32]

2.7.3 Výzkum in vivo

Byla zkoumána aplikace nízkofrekvenčního ultrazvuku na zvýšení aktivity vancomycinu proti implantovanému biofilmu *Staphylococcus epidermidis*. Polyethylenový disk pokrytý biofilmem *Staphylococcus epidermidis* byl implantován subkutánně králíkovi na obě strany páteře. Po dobu trvání experimentu dostával králík systematicky antibiotikum vancomycin. Disky byly ozvučovány po různou dobu. Jeden disk byl ozvučován po dobu 24 nebo 48 hodin, zatímco druhý byl kontrolován. Po ozvučení byly vyjmuty a poté spočítány životaschopné bakterie. Po 24 hodinovém ozvučení nebyl výrazný rozdíl mezi kontrolovaným a neo-zvučenými biofilmem, zatímco po 48 hodinách ozvučení byly na ozvučeném disku přítomny statisticky méně životaschopné bakterie. Léčba odpovídala příznivě kombinaci ultrazvuku a vankomicinu, ale na Gram-pozitivní organismy je požadován delší čas léčby než byl sledován dříve na Gram-negativní druhy. [33]

Biofilm *Escherichia coli* na dvou polyetylenových discích byl implantován subkutánně do králíka přijímajícího systematicky gentamicin. Ultrazvuk byl aplikovaný 24 hodin na jeden disk. Oba disky byly vyjmuty a poté se spočítali životaschopné bakterie. Pulzní ultrazvuk výrazně zredukoval životaschopnost bakterií oproti neozvučeným a to bez zničení kůže. [34]

Cílem studie bylo vyšetřit, zda ultrazvuk v kombinaci s gentamicinem snižuje životaschopnost bakterií v biofilmu na kostním cementu in vivo. Bakteriální přežívání na kostním cementu v přítomnosti a nepřítomnosti ultrazvuku bylo srovnáváno na králíčím modelu. Dva vzorky kostního cementu s biofilmem *Escherichia Coli* byly implantovány do králíků. Ve dvou skupinách kostního cementu byl disk naočkován gentamicinem, bylo použito čerstvě připravené a staré antibiotikum. Byl použit disk nenačkovaného kostního cementu v kombinaci se systematickým podáváním gentamicinu a pulzním ultrazvukem. Po utracení králíků a vyjmutí bakterií z disku, byl spočítán počet životaschopných bakterií a vzorky kůže byly analyzovány pro histopatologické vyšetření. Aplikace ultrazvuku v kombinaci s gentamicinem zredukovala životaschopnost biofilmu. Histopatologická zkouška neukázala žádné léze. Použití ultrazvuku v tomto modelu se ukázalo být bezpečné. Studie naznačuje, že ultrazvuk může zvýšit prevenci infekce ihned po operaci, hlavně proto, že biomateriály, gentamicin a ultrazvuk užívané v tomto modelu jsou všechny klinicky lehce dostupné. [35]

Infekční biofilmy jsou běžnou komplikací protéz u lidí. Předchozí výzkumy in vitro ukázaly, že nízkofrekvenční ultrazvuk kombinovaný s aminoglykosidovými antibiotiky je efektivní metoda k hubení biofilmů. Dva 24 hod staré biofilmy *Escherichia Coli* rostoucí na polyetylenovém disku byly implantovány subkutánně na záda samice bílého králíka, jedna z každé strany páteře. Nízká frekvence a nízký výkon nepřetržité ultrazvukové léčby byl aplikován 24 hodin s a bez systematického podávání Gentamicinu. Disk byl poté přemístěn a spočítán počet životaschopných bakterií na každém disku. Při nízké ultrazvukové síle a vystavení pouze ultrazvuku (ne gentamicinu) ozvučení nezpůsobilo žádný významný rozdíl v životaschopnosti bakterií. V přítomnosti antibiotik byla pozorována významná redukce díky ultrazvuk o výkonu 300 mW/cm^2 , ale při výkonu 100 mW/cm^2 nebyla významná. Zničená kožní tkáň byla pozorována při léčebné úrovni 300 mW/cm^2 . [36]

Kombinací gentamicinu a ultrazvukové expozice po dobu 24 hodin byla předběžně dokázána redukce životaschopnosti biofilmu *Escherichia coli* in vivo. Takové léčba po dobu

48 hod redukuje životaschopnost biofilmu *Escherichia coli* na téměř neměřitelnou úroveň. Nicméně, když byl biofilm *Pseudomonas aeruginosa* implantován a léčen po dobu 24 a 48 hod, žádná významná redukce životaschopnosti bakterií po použití ultrazvukem pozorována nebyla. Rozdíl v reakci těchto dvou organismů je připisován lepší permeabilitě a stabilitě vnější membrány *Pseudomonas aeruginosa*. [37]

Podle výše předložených studií můžeme usuzovat, že vliv ultrazvuku na bakterie je za různých okolností různý. Záleží na intenzitě i frekvenci ultrazvuku, na kombinaci s jinými látkami a také na druhu bakterií samotných. Při výzkumu vlivu ultrazvuku na růst bakterií bylo zjištěno, že ultrazvuk při nižších frekvencích urychluje jejich růst tím, že podporuje transport kyslíku a výživných látek do buňky a transport metabolitů z buňky ven. Naopak při vyšších frekvencích docházelo k jejich částečnému ničení.

3. Praktická část

3.1 Použité přístroje a pomůcky

- Ultrazvuk BTL-07p
- Luminometer Thermostated LMT 01

3.2 Postup měření a popis metod

3.2.1 Roztok bakterií

Pro ozvučování a měření byl použit roztok geneticky upravených luminiscentních bakterií *Escherichia coli* o objemu 50 ml a při měření byl udržován při teplotě 37°C. Bakterie byly kultivovány na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

Rod *Escherichia* – gramnegativní rovné tyčky vyskytující se jednotlivě a ve dvojicích, některé tvoří pouzdra, fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní. Optimální teplota inkubace je 37°C. Mají značnou biochemickou aktivitu, glukózu i jiné cukry okyselují s tvorbou plynu. Vyskytují se jako normální flora v koncové části střevního traktu teplokrevných živočichů. Kmeny *E. Coli*, které produkují enterotoxin a/nebo jiné faktory virulence způsobují průjemová onemocnění. Tento druh je také hlavním původcem infekcí močových cest a nozokomiálních infekcí včetně septikemií a meningitid. *E. coli* se vyskytují ve střevní mikrofloře obratlovců jako užitečný komenzál, kmeny s produkcí shigatoxinů (verotoxinů) mohou vyvolat závažná onemocnění hemoragická kolitida a hemolytickouremický syndrom. [38]

Bioluminiscence (vlastní produkce světla) je schopna řada organismů (např. Světlušky, medúzy). Z bakterií jsou to převážně mořské druhy a jediný terestrický rod *Photobacterium* žijící v symbióze s enteropatogenními hlístovkami. V této práci byl použit modifikovaný bakteriální kmen *Escherichia coli* (K12pGFPluxBAm), jehož plazmid obsahuje gen pro enzym luciferázu a substrát – aldehyd s dlouhým řetězcem (plazmid pochází z bakterie *Photobacterium*). Světelná emise je výsledkem reakce kdy enzym luciferáza katalyzuje oxidaci aldehydu a redukovaného riboflavin fosfátu produkovaného pouze živými buňkami. Existuje tedy přímá korelace mezi viabilitou bakterií a produkcí světla, proto je detekce bioluminiscence velmi výhodná v řadě aplikací. [39]

3.2.2 Ozvučení

Ze zásobního roztoku bakterií (OD 0,5) byl odebrán 1 ml do umělohmotné zkumavky, která byla vložena do otočného držáku ve vodní lázni o teplotě 37°C, kde se zkumavka otáčela, aby byl vzorek ozářen rovnoměrně. Vzorek byl ozvučován ultrazvukovými vlnami po dobu 10 minut, intenzitě 2 W/cm² a frekvenci 1 nebo 3 MHz. Při ozvučování byla zkumavka i hlavice ultrazvuku ponořena ve vodě, hlavice byla od zkumavky ve vzdálenosti 25 cm zaručující homogenitu pole (vzdálené UZ pole). Jako zdroj ultrazvuku byl použit terapeutický ultrazvuk BTL-07p.



Obr. 3.1: Zdroj terapeutického ultrazvuku BTL-07p

3.2.3 Luminometr

Po ozvučení byly ze vzorku odebrány čtyři vzorky o stejném objemu 200 μl . Stejně tak byly odebrány čtyři vzorky po 200 μl zásobního roztoku jako kontrola pro srovnání výsledku. V luminometru byly vzorky měřeny po dobu 10 minut a byla v něm udržována teplota 37°C. Luminometr byl propojen s počítačem a pracoval v programu Kilia.

Luminometrie patří do spektroskopických metod, které jsou založené na interakci elektromagnetického záření s molekulami analyzované látky. Při absorpci zářivé energie molekulou dochází k přechodu valenčních elektronů do vyšších energetických stavů nebo ke změnám vibračních a rotačních stavů molekuly. Absorbovaným zářením excitovaná molekula přechází pak zářivými nebo nezářivými deexcitačními mechanismy zpět do základního stavu. Na zářivé deexcitaci molekul excitovaných elektromagnetickým vlněním jsou založeny metody fluorescenční molekulové spektroskopie.

Fotoluminiscenční metody jsou založeny na měření sekundárního záření emitovaného molekulami předem excitovanými absorpcí záření v téže spektrální oblasti. Při měření se nejčastěji využívá fluorescence, která se liší od fosforescence podstatně kratším časovým intervalem mezi ozářením a ukončením emise záření (dosvitem). K excitaci fluorescenčního záření je nutno použít záření o stejné nebo větší energii (stejně nebo kratší vlnové délky) než má záření emitované (sekundární). Proto se používá k excitaci fluorescenčního záření ve viditelné oblasti spektra ultrafialového záření, jehož zdrojem je nejčastěji rtuťová výbojka. Ze záření, které výbojka emituje (primární záření) se monochromátorem izoluje záření konkrétní vlnové délky, které prochází měřeným roztokem. Působením tohoto záření přecházejí molekuly látky do energeticky vyšších excitovaných stavů a jejich přechod do základního stavu se projeví vyzářením luminiscenčního záření (zářivá deexcitace), jehož intenzita je úměrná koncentraci luminiscenční látky. Fluorescenční záření vychází z kyvety, ve které je měřená látka, všemi směry, měří se však záření vycházející z kyvety ve směru kolmém na primární záření, čímž se eliminuje vliv tohoto záření na změřené hodnoty. Fluorescenční (sekundární) záření prochází optickým filtrem nebo monochromátorem, které izolují záření vysílané měřenou látkou a to pak dopadá na detektor. K detekci se používají fotonky nebo fotonásobiče. Metodu je možno používat i pro stanovení anorganických látek, které normálně nejeví fluorescenční vlastnosti po převedení do vhodných komplexních sloučenin. [40]

3.3 Naměřené výsledky

Na začátku bylo provedeno testování vlivu různých frekvencí a časů na viabilitu bakterií (neukázáno). Na základě tohoto testování byly jako optimální podmínky ozvučování vybrány $2\text{W}/\text{cm}^2$ (intenzita ozvučování) a čas 10 min. Za těchto podmínek byl nejlépe pozorovatelný rozdíl mezi kontrolou a aplikací. Poté bylo provedeno několik sad měření s těmito parametry, ze kterých byly do této práce vybrány jen 2 sady. Základním problémem se totiž ukázala kultivace bakterií, kdy pravděpodobně na základě změny některých chemikálií při přípravě kultivačního média docházelo k nestandardnímu chování bakterií (zejména změna luminiscence a viability kontrol).

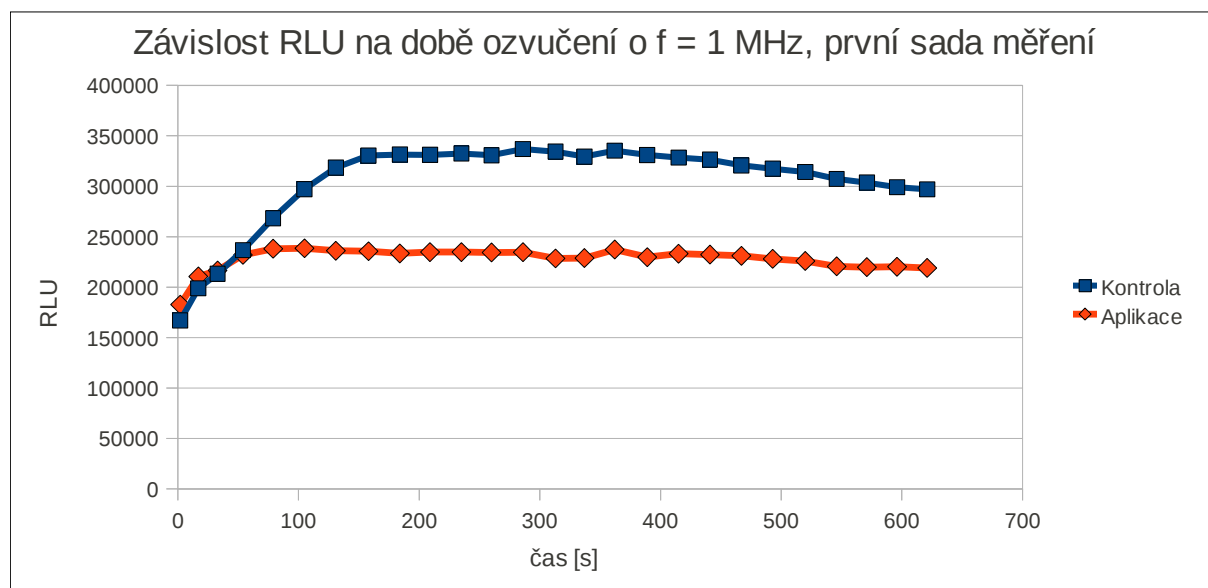
Vlastní měření probíhalo tak, že ze zásobního roztoku bakterií o objemu 50 ml, optické hustotě 0,5 temperovaného při 37°C byl pro každé měření odebrán 1 ml a ozvučen ultrazvukem o frekvenci 1 MHz, intenzitě $2\text{W}/\text{cm}^2$ po dobu 10 minut. Z tohoto ozvučeného vzorku bylo poté odebráno po 200 μl do čtyř jamek pro změření luminiscence v luminometru. Stejně tak bylo odebráno po 200 μl zásobního roztoku jako kontroly pro srovnání. Stejným způsobem bylo provedeno ozvučení při frekvenci 3 MHz.

Při první sadě měření bylo ozvučeno 6 vzorků o frekvenci 1 MHz a 6 vzorků o frekvenci 3 MHz. Tzn. 24 výsledků pro každou frekvenci. Pro druhou sadu měření bylo provedeno 11 měření pro 1 MHz a 9 měření pro 3 MHz, tedy 44 a 36 výsledků. Z těchto výsledků byly odebrány ty, které se výrazně lišily od ostatních (zjevná systémová chyba – špatné pipetování apod). Z vybraných výsledků se poté pro každé měření spočítal průměr jak pro kontrolu, tak pro ozvučený vzorek a z těchto průměrů se odečetl počet bakterií v časech 2, 60, 120 a 300 s. Hodnoty byly poté přepočítány na procenta, kde se jako 100 % brala kontrola. To bylo spočítáno podle vzorce $x \cdot 100 / y$ kde x je hodnota ozvučeného vzorku a y je hodnota kontroly. Poté byl spočítán rozdíl hodnot kontroly a vzorku: $100 - \text{vzorek}$. Dále se již počítalo pouze s procentuálními rozdíly aplikací vůči kontrole.

čas	kontrola	aplikace	rozdíl	% aplikace	% rozdíl
0	194990,00	47812,25	147177,75	24,52	75,48
60	298202,74	68304,22	229898,52	22,91	77,09
120	256723,91	86656,32	170067,59	33,75	66,25
300	334574,27	118427,95	216146,32	35,40	64,60

Tabulka 3.1: Příklad výpočtu procent

První sada měření

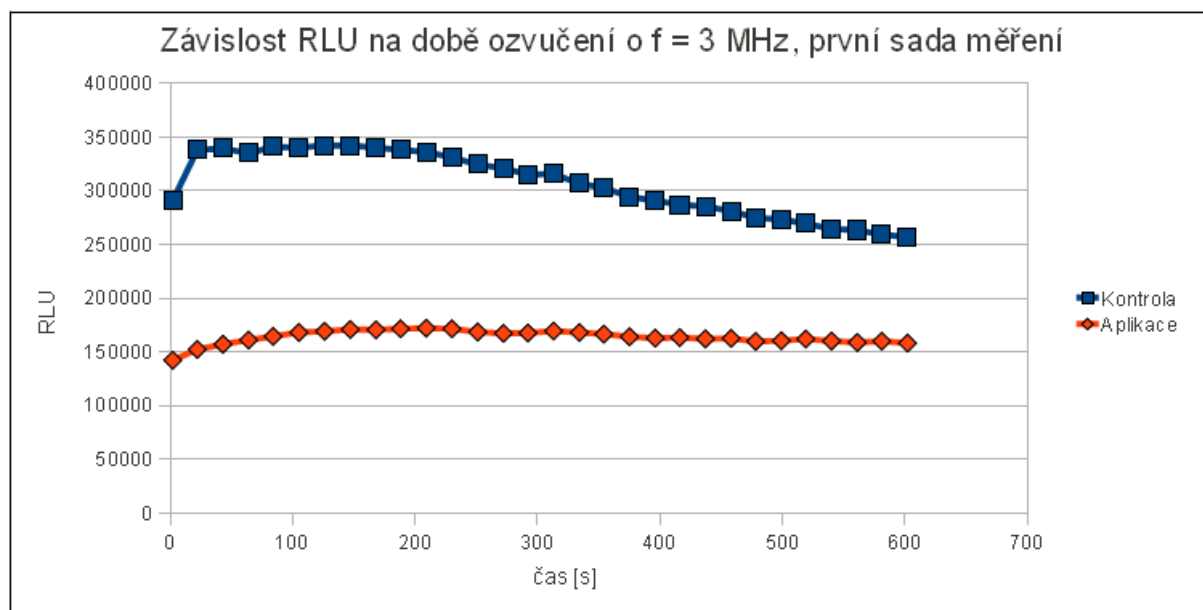


Graf č. 1: Závislost relativní luminiscence na době ozvučení $f = 1$ MHz

čas [s]	Kontrola	Aplikace	čas [s]	Kontrola	Aplikace
2	166961,5	182645	313	334285,75	228498
17	198881	210583,25	337	329421,25	228781,25
33	213206	216455,75	362	335303,25	237237
54	236656,5	231934	389	330991	229704,75
79	268341,75	238039,25	415	328400,5	233177,75
105	297152,25	238533,75	441	326385,25	232252
131	318458,75	236047	467	320652,5	231041,5
158	330519,25	235564	493	317369,25	228028,5
184	331436,25	233414,75	520	314183,75	225955,75
209	331175	234802	546	307286,5	220617
235	332509	234749,5	571	303655,5	219854,5
260	330697,5	234365	596	299107,25	220169
286	336861,75	234626,5	621	296971	219029,5

Tabulka 3.2: Hodnoty grafu č. 1

První den bylo provedeno 6 měření při frekvenci 1 MHz, intenzitě 2 W/cm^2 a době ozvučení 10 minut. Zde je jako příklad vložen graf pro jedno měření. Do průměru bylo zahrnuto 12 výsledků, ty byly poté zprůměrovány a vloženy do grafu. Na grafu je vidět rozdíl mezi aplikací a kontrolou. Protože ale nějakou dobu trvá, než se hodnoty bakterií při měření ustálí (37°C), použijme pro srovnání dobu ozvučení 300 s. Průměrná hodnota kontroly v tomto čase měření (při zaokrouhlení na celá čísla) byla 335 526 a aplikace 231 448 což je rozdíl o 104 077, což dělá 31 %.



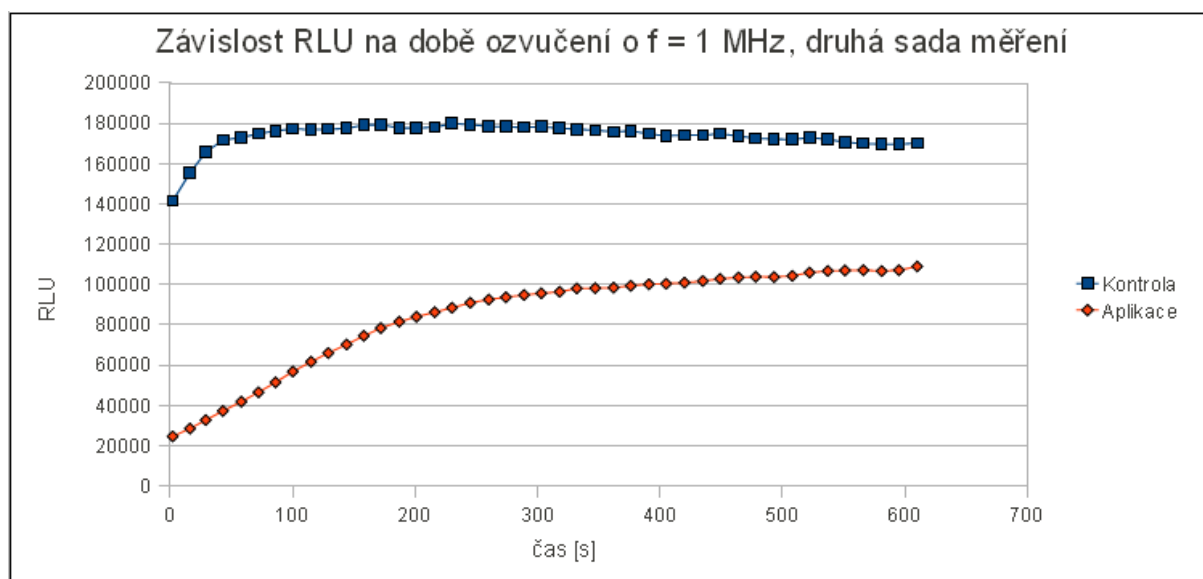
Graf č.2: Závislost relativní luminiscence na době ozvučení $f = 3 \text{ MHz}$

čas [s]	Kontrola	Aplikace	čas [s]	Kontrola	Aplikace
2	291109,5	142469	313	315705,25	169711,25
22	338271	152456,25	334	306876	168278,5
43	339475,5	157346,25	354	302980,5	166722
64	335117,25	161218,5	375	294481,75	164295,25
84	341031	164649,5	396	290960	163005
105	340326,5	168307,75	416	287219,75	163558,75
126	342258,5	169342,5	437	285595,25	162333,25
147	342221,25	171066	458	281245,25	162773
168	340410	170725,5	478	274957,75	159909,5
188	338087	171725,25	499	273554,5	160635
209	336399,5	172257,75	519	269509,75	162205
230	331092	171761,5	540	264702,75	160337,25
251	324663,5	168752	561	263486,5	158919,5
272	320995,25	167446	581	259415,5	160163,25
292	315383,25	167767,5	602	257078,25	158406

Tabulka 3.3: Hodnoty grafu č. 2

První den bylo také provedeno 6 měření při frekvenci 3 MHz, intenzitě 2 W/cm^2 a době ozvučení 10 minut. Počet hodnot a zpracovaných do grafu bylo 24. V tomto grafu můžeme vidět taktéž rozdíl mezi aplikací a kontrolou. Průměrná hodnota kontroly v čase měření 120 s byla 441 707 a aplikace 169 047 což je rozdíl o 172 660, což dělá téměř 51 %.

Druhá sada měření

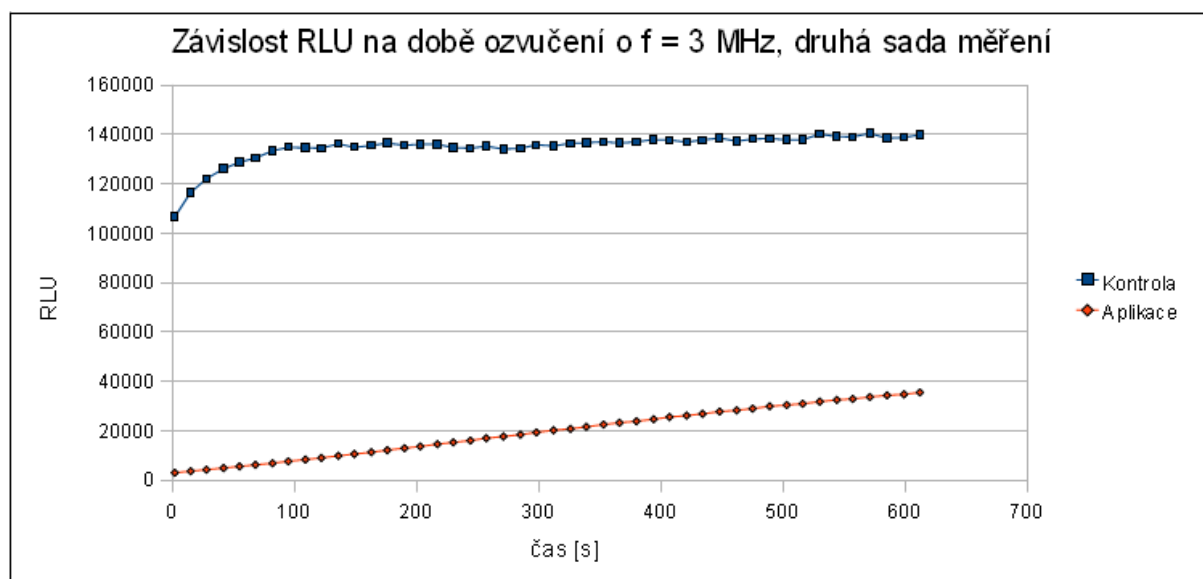


Graf č.3: Závislost relativní luminiscence na době ozvučení $f = 1$ MHz

čas [s]	Kontrola	Průměr	čas [s]	Kontrola	Průměr
2	291109,5	142469	313	315705,25	169711,25
22	338271	152456,25	334	306876	168278,5
43	339475,5	157346,25	354	302980,5	166722
64	335117,25	161218,5	375	294481,75	164295,25
84	341031	164649,5	396	290960	163005
105	340326,5	168307,75	416	287219,75	163558,75
126	342258,5	169342,5	437	285595,25	162333,25
147	342221,25	171066	458	281245,25	162773
168	340410	170725,5	478	274957,75	159909,5
188	338087	171725,25	499	273554,5	160635
209	336399,5	172257,75	519	269509,75	162205
230	331092	171761,5	540	264702,75	160337,25
251	324663,5	168752	561	263486,5	158919,5
272	320995,25	167446	581	259415,5	160163,25
292	315383,25	167767,5	602	257078,25	158406

Tabulka 3.4: Hodnoty grafu č. 3

V druhé sadě bylo provedeno 11 měření za stejných podmínek jako v první a do grafu bylo zahrnuto 22 hodnot. Na vybraném grafu můžeme vidět prudký vzrůst počtu bakterií v prvních 200 s. Okolo 250 s se hodnoty ustálily a rostly pozvolně. V čase 300 s byla hodnota kontroly 178 373, aplikace 95 559 a jejich rozdíl 82 814. To je 46 %.

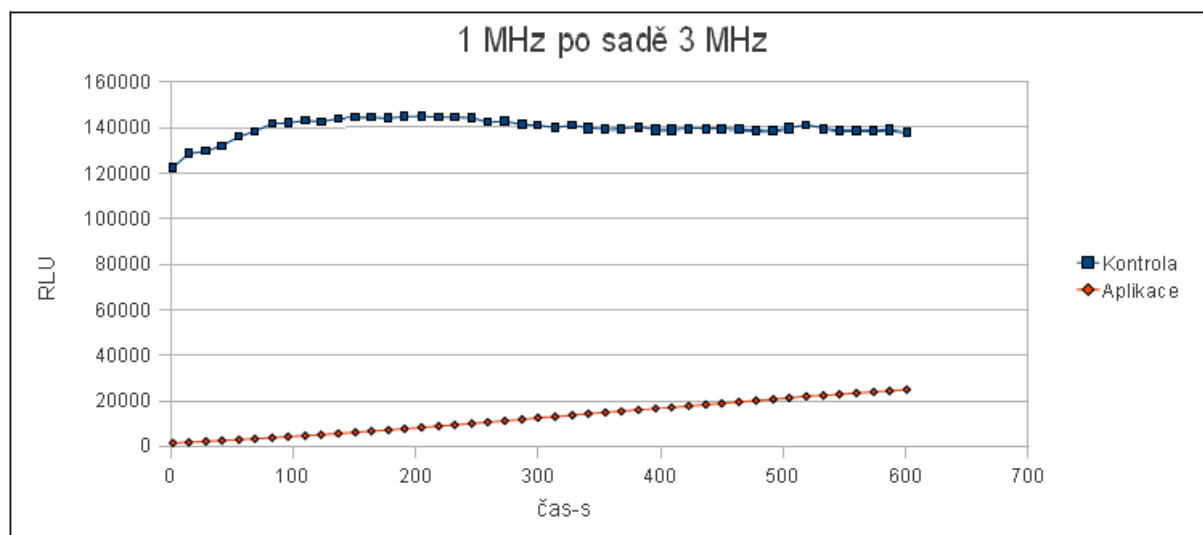


Graf č. 4: Závislost relativní luminiscence na době ozvučení $f = 3$ MHz

cas [s]	Kontrola	Aplikace	cas [s]	Kontrola	Aplikace
2	106672,75	3110,25	312	135397,75	20286,5
15	116623,25	3748,25	326	136487	20890,25
28	122105,25	4368,25	339	136699,25	21702,75
42	126229,5	5013,25	353	137085,25	22648,25
55	128806,25	5673	366	136591	23360,75
68	130505,75	6312	380	137052,25	23957,75
82	133424,5	6966,25	394	138001,5	24801
95	134858,25	7726,25	407	137773,25	25679,75
109	134622,5	8456	421	136982	26247,25
122	134513,5	9137	434	137824,75	26958,25
136	136276,5	9976	448	138589,5	27874
149	134844,25	10693,75	462	137355,25	28398,25
163	135593,25	11435,5	475	138176,75	29093
176	136536,5	12274,25	489	138450,75	30018,75
190	135665,75	13056,25	503	137837,5	30513,25
203	136067,5	13757,75	516	137885,5	31067
217	136026,75	14679,25	530	140217,75	31893
230	134776,25	15399,5	544	139154,5	32606,75
244	134456,75	16148,25	557	139107,25	33016
257	135312	17091,25	571	140504,5	33766,25
271	134159,25	17784,25	585	138512	34470
285	134418,5	18522,25	599	138909,5	34855,25
298	135855,75	19443,5	612	139901,75	35647,5

Tabulka 3.5: Hodnoty grafu č. 4

U frekvence 3 MHz bylo změřeno 9 vzorků a z nich zprůměrováno 28 hodnot. U všech těchto měření byl velký rozdíl aplikace oproti kontrole. Ten se pohyboval okolo 97 % a pozvolna klesal k hodnotám průměrně okolo 85 %.



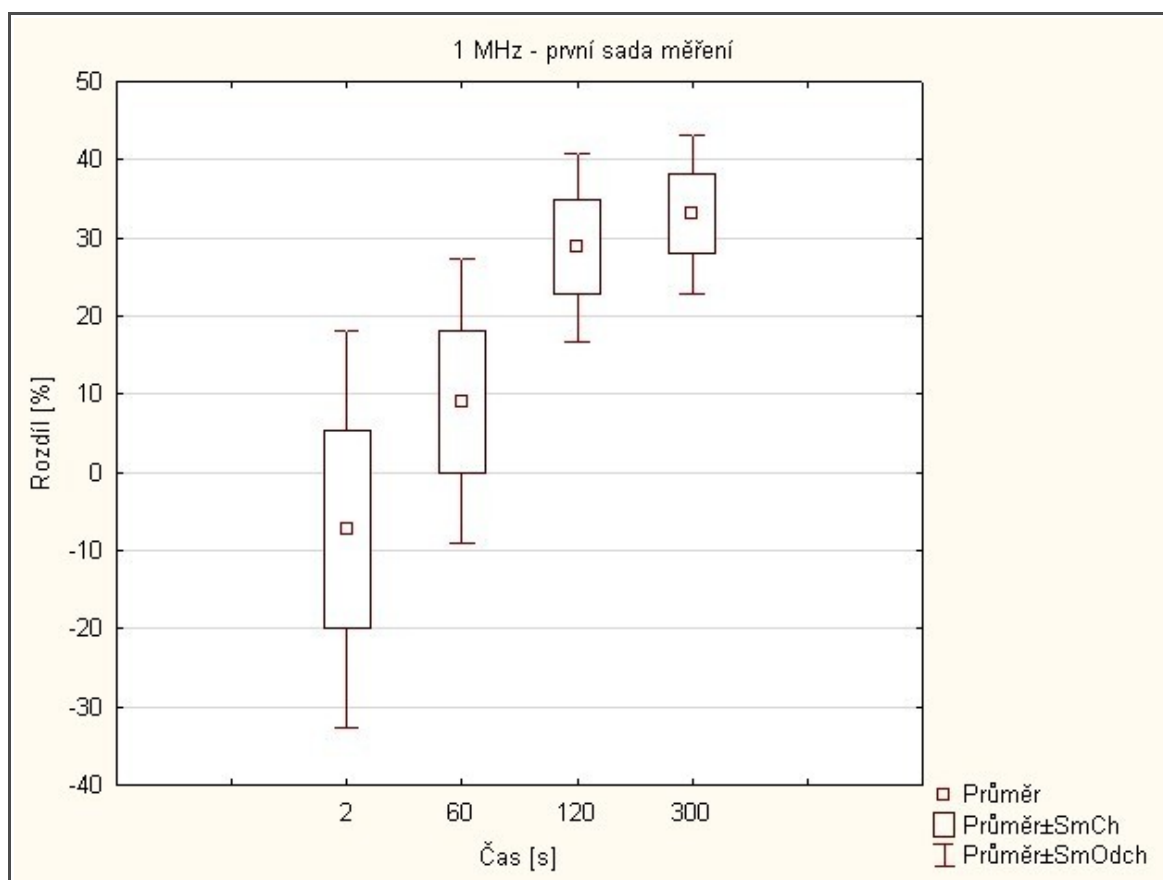
Graf č. 5: Závislost relativní luminiscence na době ozvučení $f = 1$ MHz

čas [s]	Kontrola	Aplikace	čas [s]	Kontrola	Aplikace
2	122584,75	1438,5	314	139605,25	12943,5
15	128776,25	1773,5	328	140634,25	13620,25
29	129738	2163,75	341	139482,5	14307,5
42	132209,25	2538	355	139008	14855
56	136138	2902,75	368	139117	15369
69	138554	3289,25	382	139927,75	16018,25
83	141883,75	3764,25	396	138795,75	16663,25
96	142192,75	4208,75	409	138850	17180
110	143184,5	4635,5	423	139388	17784,25
123	142696	5096,25	437	139210,25	18477,5
137	144080,75	5585,75	450	139288,5	18946
151	144012	6148,5	464	138886,25	19581,75
164	143978	6647,5	478	138484,25	20223,75
178	143704,5	7149	492	138203,5	20813,75
191	144430	7679,5	505	139472,75	21408,75
205	144551,5	8273	519	140833,5	22093,25
219	144087,5	8819,75	533	139371,75	22483,5
232	144099,5	9396	546	138311,5	22942
246	143908,5	9982,75	560	138523,75	23536
259	141916	10580,75	574	138359,5	24028
273	142323,75	11169,25	587	138775	24468,25
287	140955	11745,75	601	137656,5	25030,75
300	140605,75	12516,75			

Tabulka 3.6: Hodnoty grafu č. 5

Po sadě měření o frekvenci 3 MHz bylo pro porovnání provedeno ještě jedno měření pro frekvenci 1 MHz. Měření vyšlo v prakticky stejných hodnotách jako u 3 MHz.

Krabicové grafy

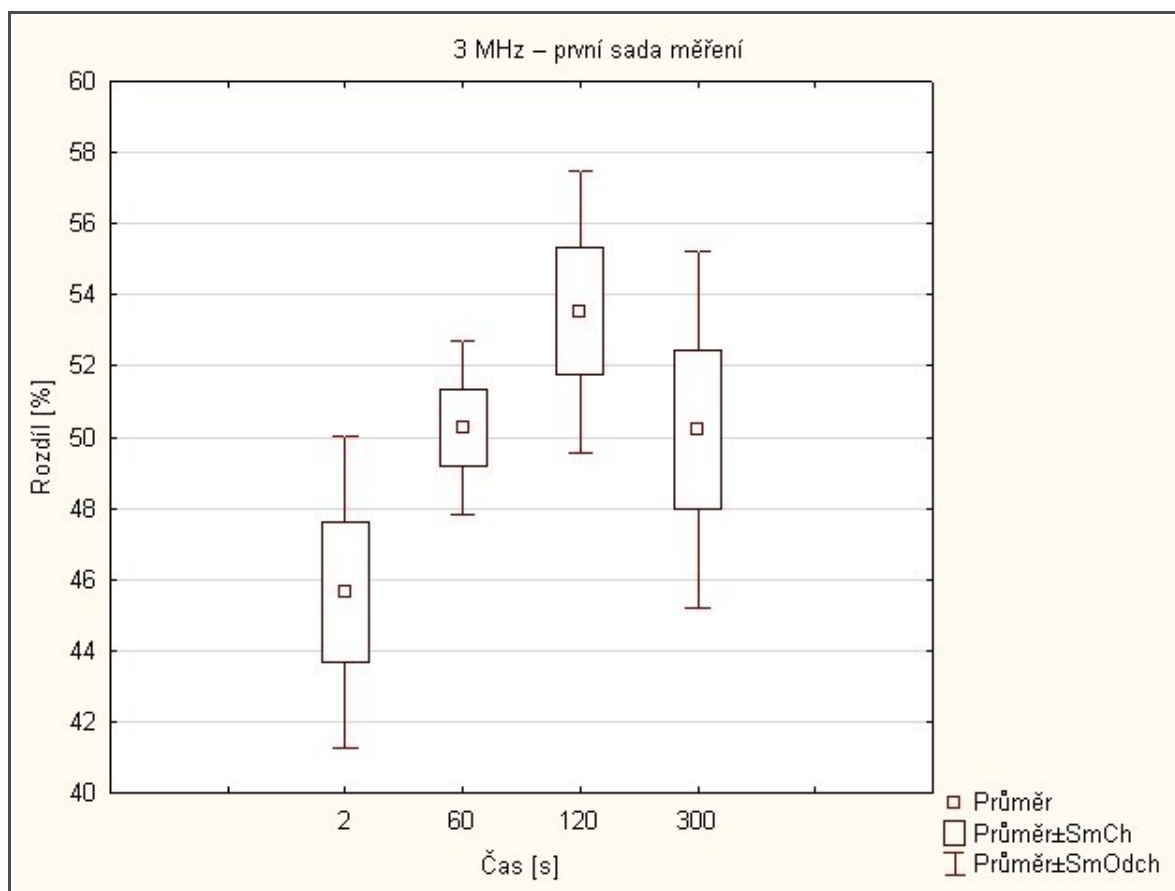


Graf č. 6: Srovnání časů pro 1 MHz

Čas [s]	Průměr [%]	Min [%]	Max [%]	Sm.Odch [%]
2	-7,28	-33,54	27,34	25,37
60	9,10	-10,98	33,09	12,15
120	28,80	16,16	42,05	12,03
300	33,03	23,35	42,02	10,21

Tabulka 3.7: Hodnoty grafu č. 6

Na grafu můžeme vidět, že průměrná hodnota rozdílu postupně stoupala. Kvůli tomu, že hodnoty bakterií nebyly v časech 2 a 60 s ustáleny, můžeme pro srovnání použít pouze hodnoty v časech 120 a 300 s. Ty se pohybovaly okolo 30 %.

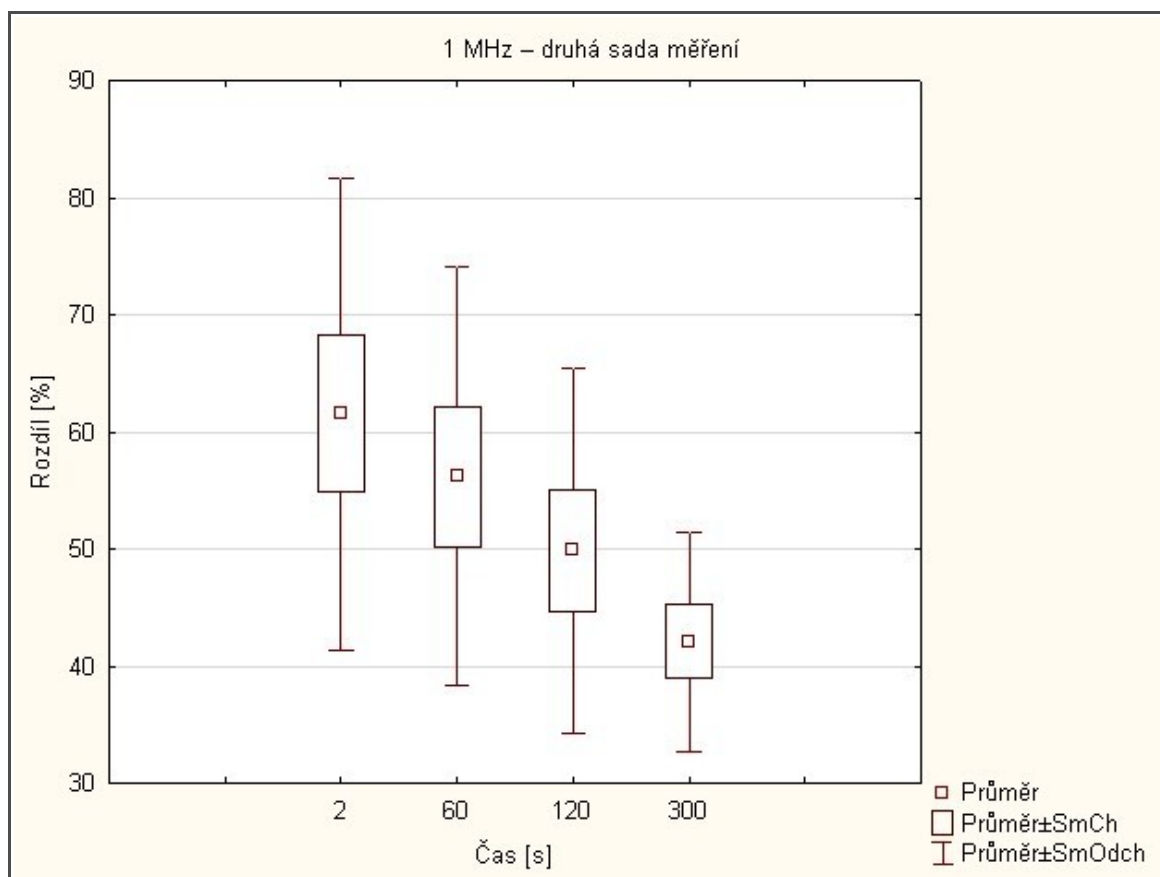


Graf č. 7: Srovnání časů pro 3 MHz

Čas [s]	Průměr [%]	Min [%]	Max [%]	Sm.Odch [%]
2	45,65	41,07	51,06	4,40
60	50,26	46,48	52,51	2,43
120	53,54	49,06	59,16	3,96
300	50,21	43,79	55,88	5,00

Tabulka 3.8: Hodnoty grafu č. 7

U 3 MHz hodnoty v 2, 60 a 120 stoupaly a v čase 300 s hodnota klesla na téměř stejnou jako u 60 s. Můžeme si také všimnout, že nejmenší odchylka byla v čase 60 s a největší v čase 300 s.

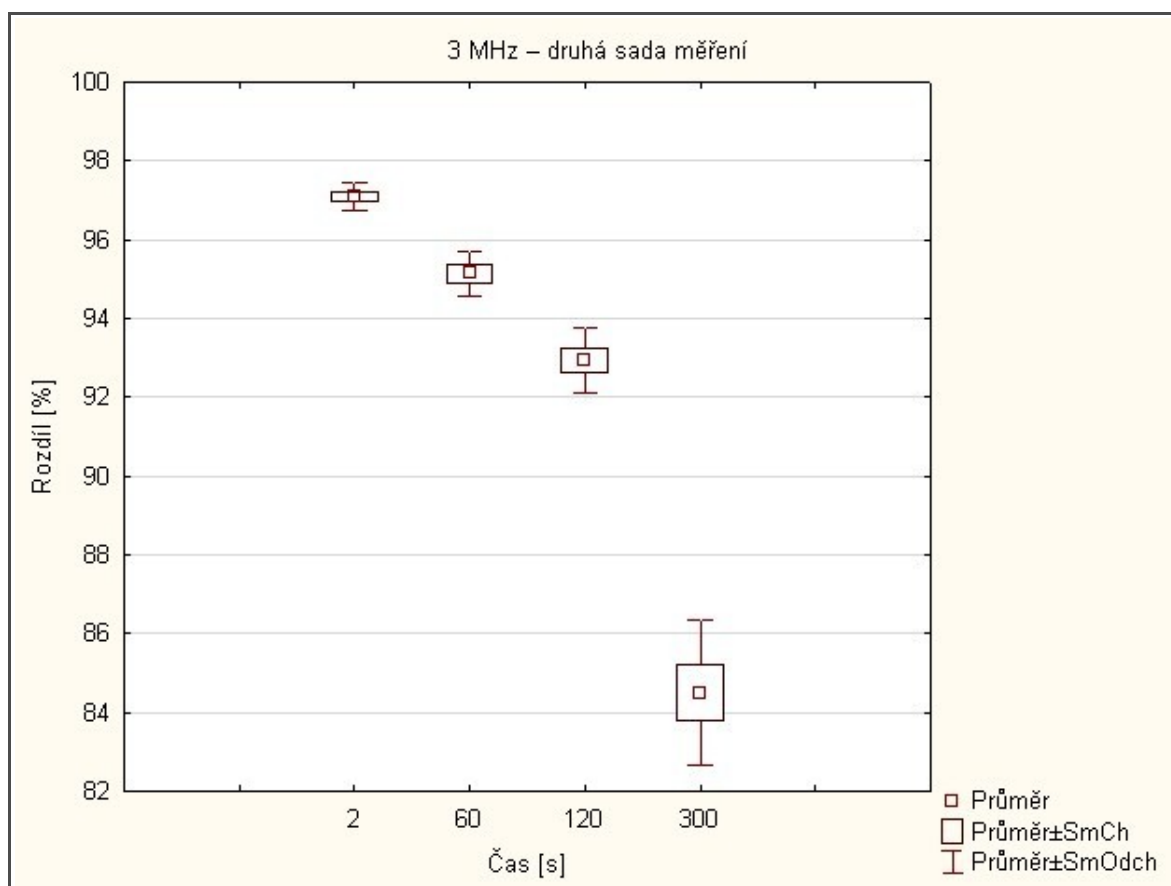


Graf č. 8: Srovnání časů pro 1 MHz, druhý den

Čas [s]	Průměr [%]	Min [%]	Max [%]	Sm.Odch [%]
2	61,51	26,16	82,56	20,10
60	56,18	30,61	75,41	17,89
120	49,87	21,79	66,35	15,60
300	42,12	29,61	55,78	9,36

Tabulka 3.9: Hodnoty grafu č. 8

Na grafu č. 8 vidíme, že průměrné hodnoty pozvolna klesaly. To bylo způsobeno tím, že počty kontroly se držely přibližně ve stejných hodnotách nebo postupně klesaly a hodnoty aplikace nejdříve prudce a poté pozvolna stoupaly. V grafu je také vidět, že odchylky se postupně snižovaly.



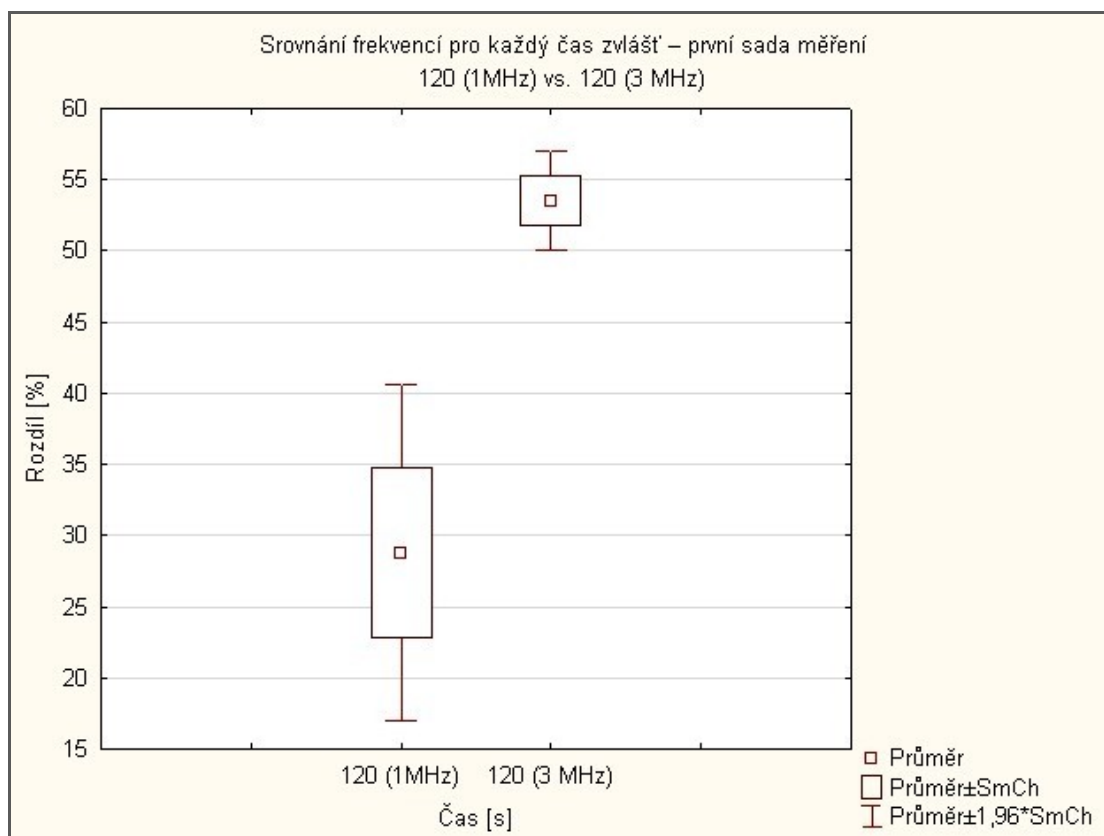
Graf č. 9: Srovnání časů pro 3 MHz, druhý den

Čas [s]	Průměr [%]	Min [%]	Max[%]	Sm.Odch[%]
2	97,10	96,87	97,85	0,34
60	95,14	94,53	96,21	0,58
120	92,94	92,09	94,37	0,83
300	84,50	81,47	87,06	1,85

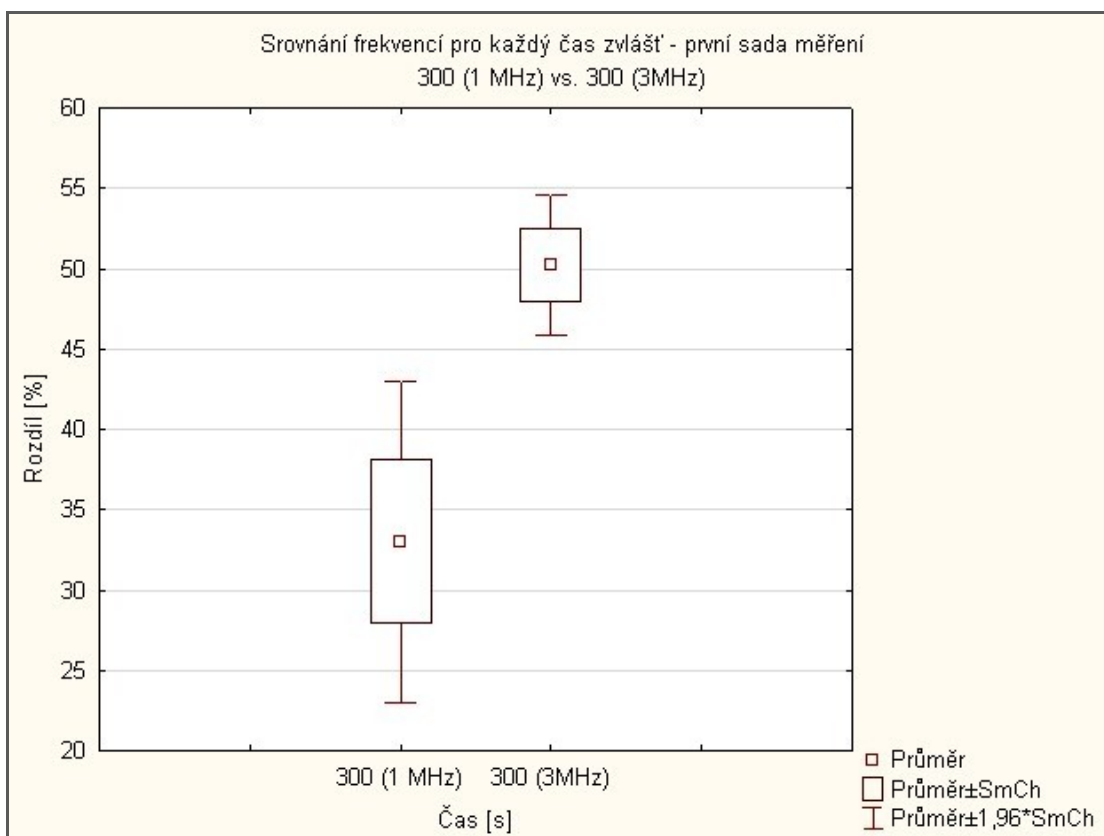
Tabulka 3.10: Hodnoty grafu č. 9

V grafu pro hodnotu 3 MHz je vidět, že hodnoty rozdílu postupně klesaly. Podle velikosti odchylek vidíme, že na začátku měření se rozdíly pohybovaly v přibližně stejných hodnotách a postupně s časem se rozdíly mezi nimi zvětšovaly.

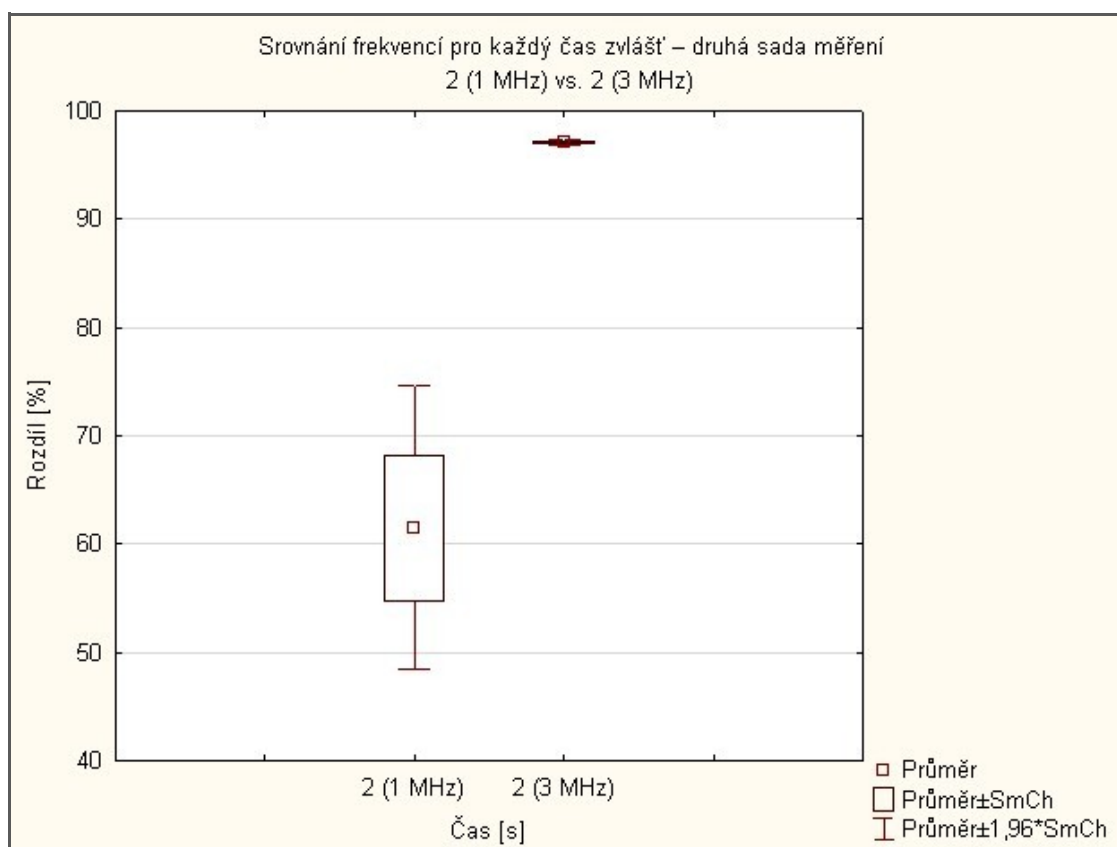
Na grafech č. 10 - 15 můžeme vidět srovnání frekvencí pro každý čas a sadu zvlášť.



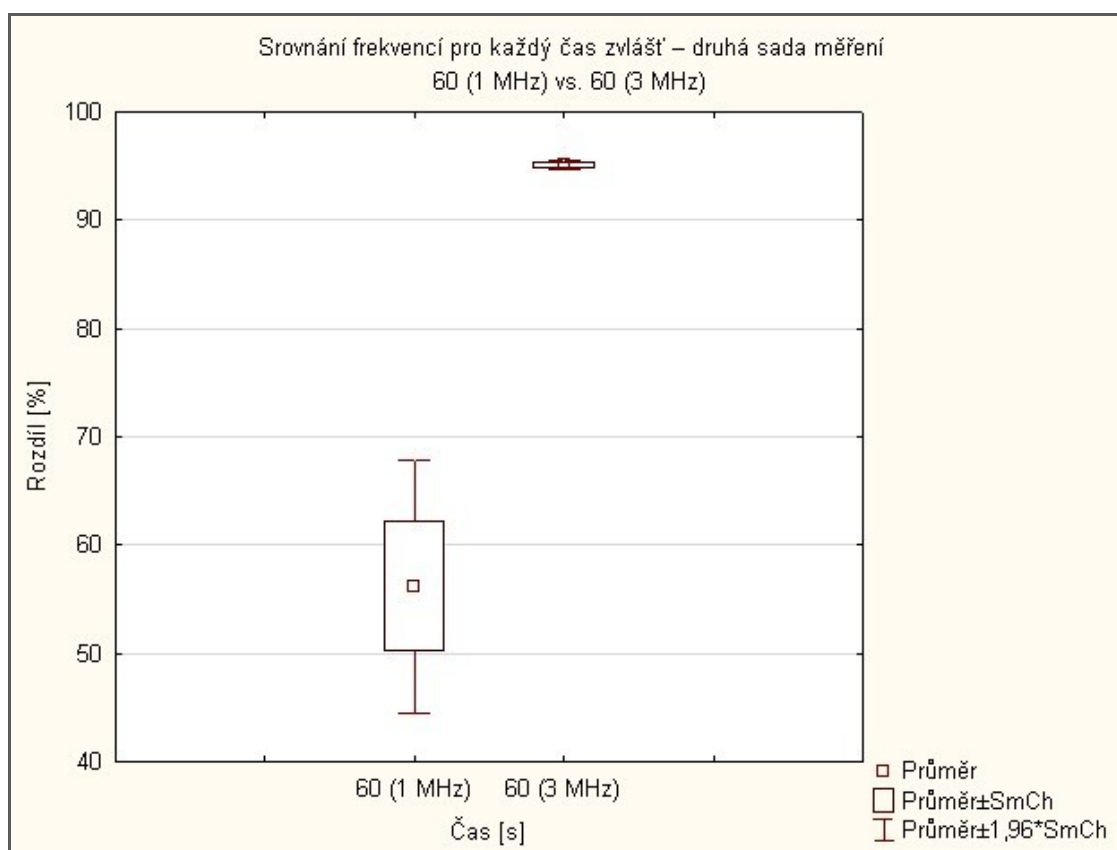
Graf č. 10: Srovnání 1 a 3 MHz v čase 120 s - první sada měření



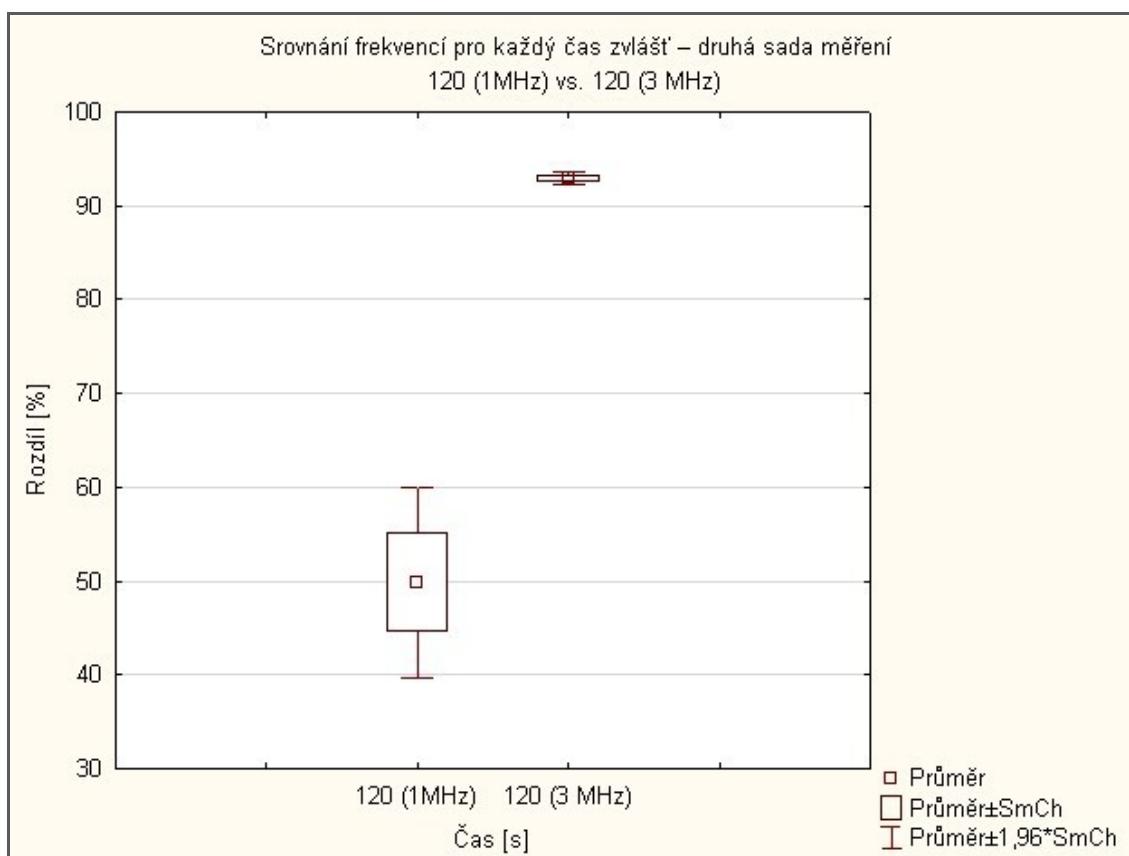
Graf č. 11: Srovnání 1 a 3 MHz v čase 300 s - první sada měření



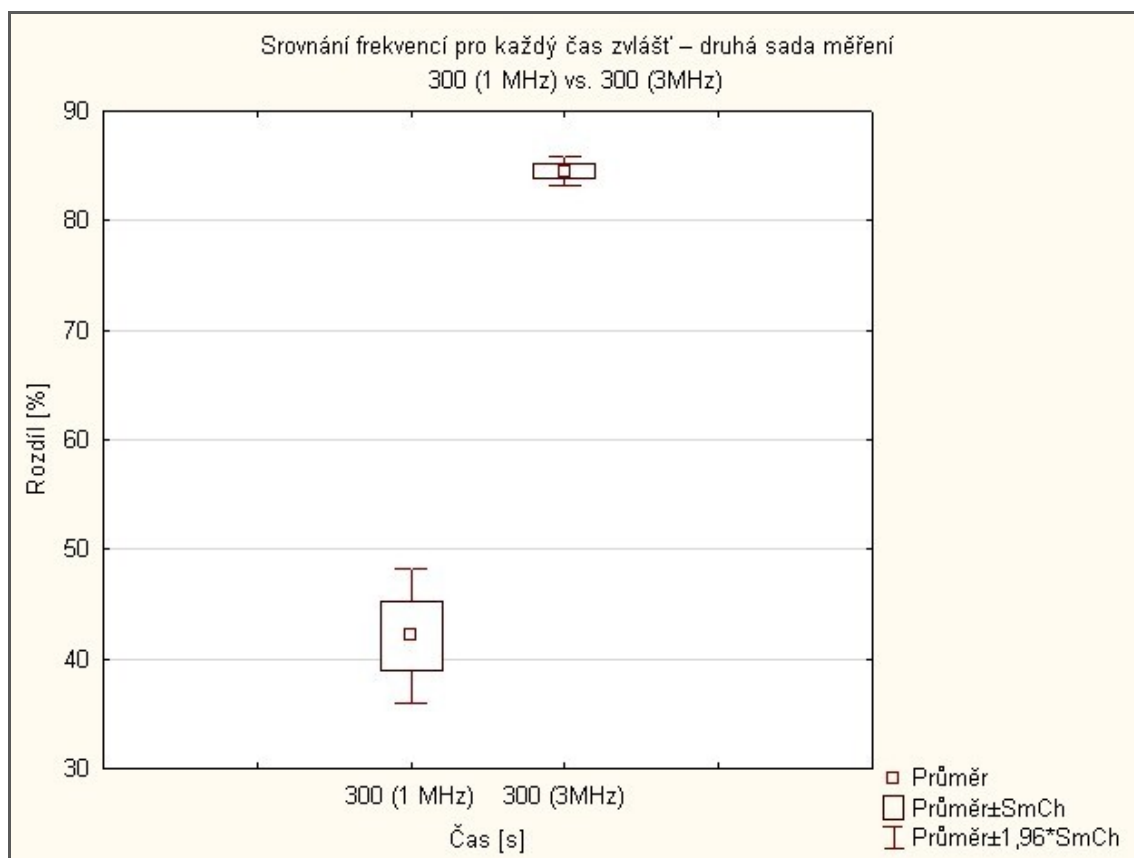
Graf č. 12: Srovnání 1 a 3 MHz v čase 2 s - druhá sada měření



Graf č.13: Srovnání 1 a 3 MHz v čase 60 s - druhá sada měření



Graf č. 14: Srovnání 1 a 3 MHz v čase 120 s - druhá sada měření



Graf č. 15: Srovnání 1 a 3 MHz v čase 300 s - druhá sada měření

4.4 Diskuze

V této práci byl zkoumán vliv ultrazvuku na roztok bakterií *Escherichia coli*. Bakterie byly geneticky upravené a měly schopnost luminiscence. Ta se poté po ozvučení měřila na luminometru, stejně jako schopnost luminiscence u kontrolních, neozářených bakterií ze zásobního roztoku. Měření bylo prováděno několik dnů na každý den byly bakterie inkubovány den předem a poté naředěny na optickou hustotu 0,5. Ze zásobního roztoku bylo postupně odebíráno po jednom mililitru, ten byl ozvučen a poté změřen na luminometru. Do vyhodnocení výsledků byly vzaty 2 sady měření. Při první sadě bylo provedeno 6 měření pro 1 MHz a 6 měření pro 3 MHz. Pro druhou sadu to bylo 11 pro 1 MHz a 9 měření pro 3 MHz. Z časových důvodů nebylo možno každý den provést více měření. Pro srovnání těchto výsledků byl použit párový a nepárový t-test a zhotoveny krabicové grafy (box plot).

Při první sadě při frekvenci 1 MHz začínal počet bakterií v ozvučeném vzorku i kontroly přibližně na stejném počtu nebo byl počet kontroly ještě nižší než u vzorku ozvučeného. To bylo způsobeno tím, že zásobní roztok byl původně ponechán pouze při pokojové teplotě (asi 25°C) a vzorek byl ozvučován v lázni o teplotě 37°C. Proto chvíli trvalo než se kontrolní vzorky v luminometru ohřály na tuto teplotu a dosáhly plné hodnoty luminiscence. Z toho důvodu nemůžeme u této frekvence hodnotit a srovnávat časy 2 a 60 s – rozdíly totiž spadají až do záporných hodnot. Celkově u všech výsledků při čase 120 s se počet bakterií již ustaloval a u 300 s můžeme říct, že byl ustálen. V grafu č. 1 vidíme jak rozdíl u 60 s, kde se pohyboval kolem 9 % skočil u 120 s na hodnotu kolem 30 %.

Pokud se podíváme na grafy 1 – 5, vidíme, že hodnota luminiscence je také závislá na čase mezi přerušením ozvučování a začátkem měření v luminometru. Proto pro hodnocení a srovnávání nemá cenu brát v úvahu první čas 2 s, ale až 60 s, kdy se počty bakterií ustálí. Pro posouzení výsledků je optimální doba do 5 min (300 s), protože po této době totiž může docházet na jedné straně k růstu a na druhé straně k vymírání bakterií v důsledku vysušování zkumavek.

Pro frekvenci 3 MHz již můžeme brát v úvahu všechny vzorky od 60 s, protože zásobní roztok byl uložen v lázni o teplotě 37°C a proto ztráta teploty při aplikaci do jamek nebyla velká a vzorky se rychle ohřály na určenou teplotu. V grafu vidíme, že rozdíl stále stoupal.

Při srovnání těchto dvou frekvencí pro časy 120 a 300 s vidíme patrný rozdíl mezi průměrnými hodnotami rozdílů. U 120 s je to pro 1 MHz 29 % a pro 3 MHz 54 %. U času 300 s je to 33 % a u 3 MHz 50 %. Rozdíly se liší u obou časů přibližně o 20 %. Pokud se podíváme na směrodatné odchylky u 1 MHz, vidíme, že je značná. U 3 MHz je však podstatně menší. Proto můžeme usuzovat na rozdíly v působení 1 a 3 Mhz, tento fakt se však zatím nepodařilo prokázat.

Při druhé sadě měření byl zásobní roztok již od začátku měření uložen v lázni o teplotě 37°C. Bylo provedeno 11 měření pro 1 MHz. (Pokud se podíváme na graf č. 3 můžeme vidět, že počet bakterií v ozvučeném vzorku původně začínal na podstatně nižší hodnotě. Jejich rozdíl byl 116 976 a postupně se zmenšoval.) Nejprve počet ozvučených baterií prudce rostl a poté se pomalu ustaloval.

Při ozvučení o frekvenci 3 MHz se ozvučené bakterie chovaly úplně jinak než v předchozích měřeních. Rozdíl začínal již na začátku na 97 % a postupně se snižoval na hodnotu 85 %. Rozdíl se snižoval rovnoměrně a při srovnání v časech 120 a 300 s, kde je největší časový rozdíl klesl z 95 na 85 %. V čase 300 s také můžeme vidět větší směrodatnou odchylku oproti předchozím časům. Rozdíly se totiž u časů 2 – 120 pohybovaly ve stejných hodnotách nebo se lišily pouze o desetinné nebo setinové hodnoty. V čase 300 s se lišily již o jednotky. Při měřeních během dne se rozdíl postupně stále zvyšoval.

Po těchto získaných výsledcích pro 3 MHz jsme zkusili ozvučit jeden vzorek frekvencí 1MHz. Výsledek byl stejný jako u předchozích 3 MHz (viz. graf č. 5), dokonce ještě o v průměru 2 % větší, jakoby navazoval na zvětšující se rozdíl bez ohledu na zvolenou frekvenci.

Tento výsledek ukazuje, že citlivost bakterií na ultrazvuk se v průběhu dne měnila, tento fakt se přes konzultace s odborníky na vlastnosti bakterií nepodařilo uspokojivě vysvětlit. Měření jsme se pokoušeli zopakovat, zatím se však pro problémy při přípravě bakterií na Př.F. nepodařilo reprodukovatelné výsledky získat.

Pokud srovnáme rozdíly 1 a 3 MHz jsou pro každý čas minimálně 30 % a postupně se zmenšují, což je významný rozdíl. Pokud ale bereme v úvahu to, že se během dne nezávisle na frekvenci rozdíly zvyšovaly, nemůžeme s jistotou tvrdit, že hlavní důvod tak nízkého počtu

bakterií byla právě změna frekvence. Tyto velmi zajímavé výsledky budou předmětem dalšího zkoumání.

4. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv má působení ultrazvuku na biologické materiály.

Nejprve byla sepsána rešerše z již provedených pokusů, které zkoumaly vliv ultrazvuku na BSA, DNA a bakterie. Poté bylo měření provedeno i prakticky.

Účinky ultrazvuku lze rozdělit na tepelné a netepelné. Biologické účinky jsou závislé na intenzitě, frekvenci a době expozice. Hlavním mechanismem účinku ultrazvuku ve vodných prostředích je akustická kavitace, což je tvorba, růst a následný kolaps malých plynových bublin. Ta může i nemusí být přítomna. To závisí na intenzitě a dalších parametrech. Při působení vyšších intenzit ultrazvuku na DNA se vytváří reaktivní formy kyslíku a ty DNA poškozují. To může být po určité době opraveno. Ve vodném roztoku dochází k poškození DNA rozbitím vodíkových vazeb a zlomům v jednořetězcové a dvouřetězcové šroubovici. To je způsobeno kavitací a tepelným mechanickým efektem.

Při působení na bílkoviny jsou funkční vlastnosti bílkovin pozměněny a jejich povrchová aktivita i povrchový náboj stoupá. Zvětšuje se velikost částic a stoupá povrchová hydrofobicita. Mění se taky funkční vlastnosti.

Praktické sledování účinků ultrazvuku bylo prováděno na geneticky upravených bakteriích *Escherichia coli*, které byly schopny luminiscence. Jako zdroj ultrazvuku byl použit terapeutický ultrazvuk BTL-07p. Intenzita byla 2 W/cm^2 , doba ozvučení 10 min a frekvence 1 a 3 MHz. Pro měření hodnoty luminiscence byl použit luminometr LMT 01, ve kterém byla udržována teplota 37°C . Měření probíhalo několik dnů, pro každý den byly den předem inkubovány nové bakterie o stejných parametrech – objem 50 ml zásobního roztoku a optická hustota 0,5. Do výsledků této práce byly zahrnuty hodnoty ze dvou sad měření.

Při první sadě měření se rozdíl mezi vzorky ozvučenými frekvencí 1 MHz pohybovaly okolo 30 % a při 3 MHz to bylo okolo 50 %. Z toho by se dalo usuzovat, že vyšší frekvence má vliv na životaschopnost zkoumaných bakterií.

Pro druhou sadu měření však výsledky vycházejí jinak. Zde vidíme u 1 MHz rozdíl okolo 50%. Počty bakterií u aplikace nejdříve prudce a poté pozvolna rostly. U 3 MHz se

rozdíly pohybovaly v rozmezí 85 – 95 % a počty bakterií se pozvolna zvyšovaly. Pro otestování, zda je tento rozdíl způsobený vyšší frekvencí byl po ozvučení série vzorků o frekvenci 3 MHz ozvučen jeden vzorek o frekvenci 1 MHz. Výsledky vyšly prakticky stejné jako po ozvučení 3 MHz. Proto nemůžeme tvrdit, že hlavním důvodem je právě vyšší frekvence.

Z výše uvedených výsledků můžeme usuzovat, že ultrazvuk o frekvencích řádově jednotek MHz má vliv na životaschopnost měřených bakterií. Na výsledky má ale také vliv jejich změny životaschopnosti a citlivosti, které se průběžně během dne mění. Pro ověření těchto výsledků je však nutné provést ještě další měření, která by toto tvrzení potvrdila.

5. Seznam použité literatury

[1] HRAZDIRA, Ivo; MORNSTEIN, Vojtěch. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. Brno : Neptun, 2004. 396 s. ISBN 80-902896-1-4.

[2] MIŁOWSKA, K. . Ultradźwięki--mechanizmy działania i zastosowanie w terapii sonodynamicznej. Postepy Higieny i Medycyny do Świadczalnej [online]. 2007, 61:338-49, [cit. 2011-01-03].

[3] RIESZ, P.; KONDO, T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications.. Free Radical Biology & Medicine [online]. 1992, 13(3):247-70, [cit. 2011-01-03].

[4] DRASTICH, Aleš. Zobrazovací systémy v lékařství. Brno : Vysoké učení technické v Brně, 1990. 502 s.

[5]HRAZDÍRA, Ivo -HRAZDIRA, Luboš -MALÝ, Zdeněk -NEVRTAL, Milan
TOMAN, Jiří - VESELÝ, Tomáš. Úvod do ultrazvukové diagnostiky. Brno: Masarykova universita, 1993. 101 s. ISBN 80-210-0455-x.

[6] ACOPYAN, V. B. . Ultrasound Interactions in Biology and Medicine. New York : Plenum Press, 1983. Cavitation Thresholds in biological tissues, s. 220. ISBN 0-306-41367-1.

[7] SARVAZYAN, A. P. Ultrasound Interactions in Biology and Medicine. New York : Plenum Press, 1983. Propagation of ultrasound in solutions of biological substances, s. 220. ISBN 0-306-41367-1.

[8] FUCIARELLI, AF., et al. Induction of base damage in DNA solutions by ultrasonic cavitation.. Free Radical Biology & Medicine [online]. 1995, 18(2):231-8, [cit. 2011-01-03].

- [9] MIŁOWSKA, K. ; GABRYELAK, T. Synergistic effect of ultrasound and phthalocyanines on nucleated erythrocytes in vitro.. *Ultrasound in Medicine & Biology* [online]. 2005, 31(12):1707-12, [cit. 2011-01-03].
- [10] KAWAI , N.; IINO, M. Molecular damage to membrane proteins induced by ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*. [online]. 2003, 29(4):609-14, [cit. 2011-01-03].
- [11] GUZMÁN, HR, et al. Ultrasound-mediated disruption of cell membranes. II. Heterogeneous effects on cells..*Journal of the Acoustical Society of America* [online]. 2001, 110(1):597-606, [cit. 2011-01-03].
- [12] TOMIZAWA, M., et al. Irradiation with ultrasound of low output intensity increased chemosensitivity of subcutaneous solid tumors to an anti-cancer agent.. *Cancer Letters* [online]. 2001, 173(1):31-5, [cit. 2011-01-03].
- [13] GUZMÁN, HR, et al. Ultrasound-mediated disruption of cell membranes. I. Quantification of molecular uptake and cell viability. *Journal of the Acoustical Society of America* [online]. 2001, 110(1):588-96, [cit. 2011-01-03].
- [14] GUZMÁN, HR, et al. Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius. *Ultrasound in Medicine & Biology* [online]. 2003, 29(8):1211-22, [cit. 2011-01-03].
- [15] GUZMÁN, HR, et al. Equilibrium loading of cells with macromolecules by ultrasound: effects of molecular size and acoustic energy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2002, 91(7):1693-701, [cit. 2011-01-03].
- [16] DOSTÁL, Jiří, et al. *Biochemie pro bakaláře*. Brno : Masarykova univerzita, 2005. 174 s. ISBN 80-210-3232-4.
- [17] MIŁOWSKA, K. ; GABRYELAK, T. Reactive oxygen species and DNA damage after ultrasound exposure..*Biomolecular Engineering* [online]. 2007, 24(2):263-7, [cit. 2011-01-03].

- [18] ELSNER, HI; LINDBLAD, EB. Ultrasonic degradation of DNA. DNA [online]. 1989, 8(10):697-701, [cit. 2011-01-03].
- [19] MILLER, DL.; THOMAS, RM.; FRAZIER, ME. Ultrasonic cavitation indirectly induces single strand breaks in DNA of viable cells in vitro by the action of residual hydrogen peroxide.. Ultrasound in Medicine & Biology[online]. 1991, 17(7):729-35, [cit. 2011-01-03].
- [20] GARAJ-VRHOVAC, V.; KOPJAR, N. Investigation into possible DNA damaging effects of ultrasound in occupationally exposed medical personnel--the alkaline comet assay study.. Journal of Applied Toxicology[online]. 2005, 25(3):184-92, [cit. 2011-01-03].
- [21] GULSEREN, I., et al. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions..Ultrasonics Sonochemistry [online]. 2007, 4(2):173-83, [cit. 2011-01-03].
- [22] GAO, J, et al. Spectroscopic investigation on assisted sonocatalytic damage of bovine serum albumin (BSA) by metronidazole (MTZ) under ultrasonic irradiation combined with nano-sized ZnO.. Spectrochimica Acta. Part A, Molecular & Biomolecular Spectroscopy [online]. 2010, 77(4):895-901, [cit. 2011-01-03].
- [23] GOLIÁŠOVÁ, Hedvika. Vliv ultrazvuku na fyzikální vlastnosti roztoků biomakromolekul. Brno, 2009. 63 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně.
- [24] NORRIS, P., et al. Ultrasonically controlled release of ciprofloxacin from self-assembled coatings on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels for Pseudomonas aeruginosa biofilm prevention.. SourceAntimicrobial Agents & Chemotherapy [online]. 2005, 49(10):4272-9, [cit. 2011-01-03].
- [25] CARMEN, JC, et al. Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of Pseudomonas.Journal of Infection & Chemotherapy [online]. 2004, 10(4):193-9, [cit. 2011-01-03].
- [26] QIAN, Z.; SAGERS, RD.; PITT, WG. The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of P. aeruginosa biofilms.. Annals of Biomedical Engineering [online]. 1997, 25(1):69-76, [cit. 2011-01-03].

- [27] QIAN, Z.; STOODLEY, P.; PITT, WG. Effect of low-intensity ultrasound upon biofilm structure from confocal scanning laser microscopy observation.. *Biomaterials* [online]. 1996, 17(20):1975-80, [cit. 2011-01-03].
- [28] REDISKE, AM.; RAPOPORT, N; PITT, WG. Reducing bacterial resistance to antibiotics with ultrasound..*Letters in Applied Microbiology* [online]. 1999, 28(1):81-4, [cit. 2011-01-03].
- [29] JOHNSON, LL.; PETERSON, RV.; PITT, WG. Treatment of bacterial biofilms on polymeric biomaterials using antibiotics and ultrasound.. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 1998, 9(11):1177-8, [cit. 2011-01-03].
- [30] PITT, WG, et al. Ultrasonic enhancement of antibiotic action on gram-negative bacteria.. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* [online]. 1994, 38(11):2577-82, [cit. 2011-01-03].
- [31] DECLERCK, P., et al. Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*.. *Water Research* [online]. 2010, 44(3):703-10, [cit. 2011-01-03].
- [32] 25. PITT, WG; ROSS, SA. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth.. *Biotechnology Progress* [online]. 2003, 19(3):1038-44, [cit. 2011-01-03].
- [33] CARMEN, JC, et al. Ultrasonically enhanced vancomycin activity against *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Biomaterials Applications* [online]. 2004, 18(4):237-45,, [cit. 2011-01-03].
- [34] REDISKE, AM, et al. Pulsed ultrasound enhances the killing of *Escherichia coli* biofilms by aminoglycoside antibiotics in vivo. . *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* [online]. 2000, 44(3):771-2, [cit. 2011-01-03].
- [35] ENSING, GT, et al. Effect of pulsed ultrasound in combination with gentamicin on bacterial viability in biofilms on bone cements in vivo. . *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2005, 99(3):443-8, [cit. 2011-01-03].

- [36] REDISKE, AM, et al. Ultrasonic enhancement of antibiotic action on Escherichia coli biofilms: an in vivo model.. Antimicrobial Agents & Chemotherapy [online]. 1999, 43(5):1211-4, [cit. 2011-01-03].
- [37] CARMEN, JC, et al. Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics..American Journal of Infection Control [online]. 2005, 33(2):78-82, [cit. 2011-01-03].
- [38] SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [39] HYRŠL, Pavel, et al. Bioluminiscenční bakterie jako citlivý prostředek pro měření vlivu impulsních polí. Brno: Masarykova univerzita, studie
- [40] DRBAL, Karel; KŘÍŽEK, Martin. Analytická chemie. České Budějovice : Jihočeská univerzita, 1999. 186 s. ISBN 80-7040-352-7.

7. Seznamy použitých symbolů a zkratek

DNA	deoxyribonukleová kyselina
BSA	bovinní sérový albumin
RLU	relativní luminiscence
UZ, UZV	ultrazvuk
SmCh	směrodatná chyba
SmOdch	směrodatná odchylka